

M
TESIS
2451



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**ACCIÓN VASCULAR *IN VITRO* DE LA
UROCORTINA: INFLUENCIA DEL SEXO Y
EFECTO DE LA DIABETES.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID
F.ECONÓMICAS Y EMPRESARIALES

Entrada 04 N.º. 200300007866
12-05-03 11:49:05

TESIS DOCTORAL

ELENA SANZ BERZAL

MADRID, 2003.

R.F.M. 23171



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Sobresaliente cum laude por unanimidad
Madrid, 3 de julio de 2003

Presidente
José Marco
José Marco Martínez

Vocal 1º

Albino Garín Jarambín

Vocal 2º

Fdo: F. Javier Salas

Vocal 3º

J. MARTÍNEZ LEÓN

Secrario

JOSE VIZA

Este trabajo ha sido subvencionado, en parte con ayudas de DGICYT (SAF99.0004) y BFI 2002-01892. Asimismo, la doctoranda ha recibido una beca FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Quede constancia de nuestro agradecimiento.



Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

Ángel Luis García Villalón, Profesor Titular de Fisiología, y
Godofredo Diéguez Castrillo, Catedrático de Fisiología, Departamento
de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de
Madrid,

CERTIFICAN: Que D^a Elena Sanz Berzal ha realizado bajo su
dirección el trabajo titulado "**ACCIÓN VASCULAR *IN VITRO* DE LA
UROCORTINA: INFLUENCIA DEL SEXO Y EFECTO DE LA
DIABETES** ", como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor
dentro del Programa de Doctorado "Fisiología e Histología".

Para que conste, firmamos el presente en Madrid a ocho de
mayo de dos mil tres.

Quiero expresar mi agradecimiento

En primer lugar quiero resaltar mi más sincero agradecimiento a los directores de esta tesis, los profesores Ángel Luis García-Villalón y Godofredo Diéguez Castrillo, sin cuya dedicación y apoyo este trabajo no habría sido posible. Muchas gracias por vuestros consejos y por el tiempo que me habéis dedicado.

Al Dr. Luis Monge, por su incondicional colaboración y ayuda en todo momento.

A la Dra. Nuria Fernández, por su cordialidad y apoyo mostrado.

A Belén Climent por haber interrumpido mi vida en el laboratorio haciéndola mucho más feliz. Gracias por tu amistad.

A Esther Martínez, no tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí, toda la ayuda que me has dado. De corazón, gracias.

A Luz Mercedes Vallecilla, me ha encantado viajar a través de sus relatos.

A José M^a González. Gracias por tu inestimable ayuda en cuestiones informáticas.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por el ambiente agradable de trabajo y convivencia.

Al personal del animalario de Facultad de Medicina de la U.A.M. por el cuidado de los animales y por su colaboración

A todos mis amigos que siempre están cuando los necesitas, con los que compartes parte de los mejores momentos de la vida.

A mis hermanos, a mi padre y a mi madre, a quienes se lo debo todo, sin su ayuda no habría sido posible llegar hasta aquí. Gracias de corazón.

A Juan por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo. Sabes lo importante que eres en mi vida.

En definitiva, a todas las personas que, de un modo u otro, habéis compartido la realización de este proyecto, simplemente **MUCHAS GRACIAS.**

*Dedico esta Tesis
a mi familia y a Juan.*

INDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. UROCORTINA.....	4
2. FUNCIÓN VASCULAR.....	19
a) El endotelio y la función vascular.....	20
b) El sexo y la función vascular.....	22
c) La diabetes mellitus y la función vascular.....	26
- Disfunción endotelial en la diabetes mellitus.....	27
- Diabetes mellitus, sexo y función vascular.....	29
- Modelos experimentales de diabetes mellitus.....	30
<u>OBJETIVOS</u>	35

MATERIAL Y MÉTODOS

1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL.....	39
2. OBTENCIÓN Y MONTAJE DE LOS SEGMENTOS ARTERIALES.....	41
3. REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA.....	41
4. DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN ÓPTIMA.....	43
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	45
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	48
7. SUSTANCIAS UTILIZADAS.....	49

RESULTADOS

1. EFECTOS DE LA UROCORTINA EN LAS ARTERIAS BASILAR, CORONARIA, CAUDAL Y RENAL DE RATAS.....	53
2. ARTERIA BASILAR.....	55
3. ARTERIA CORONARIA DESCENDENTE ANTERIOR.....	57
4. ARTERIA CAUDAL.....	57

5. ARTERIA RENAL.....	58
6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL SEXO EN LA RELAJACIÓN PRODUCIDA POR LA UROCORTINA EN LAS ARTERIAS RENALES.....	59
7. EFECTOS DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LOS MECANISMOS ENDOTELIALES EN LA RELAJACIÓN PRODUCIDA POR LA UROCORTINA EN LAS ARTERIAS RENALES.....	63
FIGURAS.....	66

DISCUSIÓN

1. EFECTOS VASCULARES DE LA UROCORTINA	106
2. INFLUENCIA DEL SEXO EN LOS EFECTOS VASCULARES DE LA UROCORTINA.....	112
3. EFECTOS DE LA DIABETES EXPERIMENTAL EN LA ACCIÓN VASCULAR DE LA UROCORTINA.....	123

<u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	132
--	-----

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	137
----------------------------------	-----

INTRODUCCIÓN

1. UROCORTINA

La urocortina es un péptido de 40 aminoácidos que pertenece a la familia de péptidos relacionados con el factor de liberación de la corticotropina (CRF) (Vaughan *et al.*, 1995). Esta familia comprende un número de péptidos cuya función parece estar relacionada con la respuesta del organismo al estrés. Desde hace años se ha estudiado la capacidad del organismo para adaptarse a las situaciones de estrés y el papel que desempeña la inadaptación al estrés en el desarrollo de ciertas enfermedades. En 1981 se aisló y caracterizó el factor de liberación de corticotropina (CRF) (Vale *et al.*, 1981), lo que contribuyó al conocimiento de la respuesta al estrés en los seres humanos. Además de su función como neurotransmisor y como sustancia neuroendocrina (Heinrichs & De Souza, 1999; Dautzenberg *et al.*, 2001), el CRF puede unirse a sus receptores periféricos y de esta manera participar en la regulación del sistema cardiovascular y en la respuesta inflamatoria, todo ello relacionado con la adaptación del organismo a las situaciones de estrés.

La familia de péptidos relacionados con el CRF comprende varias sustancias tales como: la urocortina I (Vaughan *et al.*, 1995), la urocortina II (Hsu & Hsueh, 2001; Reyes *et al.*, 2001), la urocortina III (Hsu & Hsueh, 2001; Lewis *et al.*, 2001), la urotensina I (Lederis *et al.*, 1982) y la sauvagina de los anfibios (Montecucchi *et al.*, 1980). Todos estos péptidos son homólogos y ejercen su función mediante su unión, con mayor o menor afinidad, a los distintos tipos de receptores del CRF (Figura 1).



FIGURA 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la urocortina (Urc), la urotensina de los peces (Urt-p), el factor liberador de la corticotropina (CRF), la sauvagina de la rana (Svg) y la hormona diurética del insecto *Manduca sexta* (Man-s). Se pueden observar las secuencias aminoacídicas que son idénticas entre las distintas sustancias (color naranja). Las secuencias están ordenadas de mayor a menor homología.

El primer péptido de este grupo que se describió fue el CRF (Vale *et al.*, 1981). Este péptido tiene 41 aminoácidos, se expresa en neuronas del núcleo hipotalámico paraventricular cuyos axones proyectan a la eminencia media para estimular la secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH), y es esencial en el desarrollo de la respuesta al estrés. El CRF representa, por tanto, el principal controlador del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales en condiciones basales y de estrés, y sus funciones son las que cabría esperar de su papel como mediador de la respuesta al estrés. La activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales ante un estímulo estresante se inicia en el hipotálamo, que libera CRF hacia el sistema porta hipofisario. Una vez en el lóbulo anterior de la hipófisis, el CRF regula la liberación de ACTH al torrente sanguíneo para llegar a la corteza adrenal donde estimula la producción de cortisol (Revisión Owens & Nemeroff, 1991). Además, el CRF también se expresa en otras áreas cerebrales relacionadas con la respuesta al estrés; por ejemplo con la activación del sistema nervioso autónomo (Brown & Fisher, 1990; Heinrichs & Tache, 2001), la excitación (Koob *et al.*, 1990) y la ansiedad (Heinrichs & Tache, 2001; Krysiak *et al.*, 2000). Asimismo, el CRF se ha relacionado con otras funciones tales como el control de la función cardiorrespiratoria (Fisher *et al.*, 1982), la termogénesis del tejido adiposo marrón (LeFeuvre *et al.*, 1987), la inhibición de la actividad del sistema digestivo (Taché *et al.*, 1990), la inhibición del sistema reproductivo y la inducción de anorexia (Heinrichs & Richard, 1999).

La urocortina II (Hsu & Hsueh, 2001; Reyes *et al.*, 2001) es un péptido de 38 aminoácidos al cual también se ha denominado péptido relacionado con la estrescopina. La urocortina III (Lewis *et al.*, 2001), también denominada estrescopina cuando se observa en los seres humanos (Hsu & Hsueh, 2001), es un péptido de 38 aminoácidos. Tanto la urocortina II como la urocortina III son capaces de disminuir la ansiedad, la presión arterial y la excitación, y aunque su estudio prácticamente se está iniciando sus efectos parecen estar mediados por la unión selectiva a receptores CRF-R₂.

La urotensina I (Ichikawa *et al.*, 1982; Lederis *et al.*, 1983) es un péptido de 41 aminoácidos y se ha aislado en la médula espinal caudal y en la urófisis de los peces teleósteos. La sauvagina es un péptido de 40 aminoácidos aislado en la piel de una rana de América del Sur de la especie *Phyllomedusa sauvagiei* (Montecucchi *et al.*, 1980). Tanto la urotensina I como la sauvagina producen efectos similares a los que producen el CRF o la urocortina; por ejemplo, estimulan la secreción de hormona adrenocorticotropa (Rivier *et al.*, 1983), inhiben la función digestiva (Kosoyan *et al.*, 1999) y producen anorexia y termogénesis (LeFeuvre *et al.*, 1989).

La urocortina I o urocortina propiamente dicha es un péptido de 40 aminoácidos y se descubrió inicialmente cuando se realizaba un screening de la librería del DNA del cerebro rata (Vaughan *et al.*, 1995). Posteriormente se ha observado su presencia en otras especies de mamíferos como son el ratón, oveja y hombre. Su presencia en mamíferos

superiores indica que se ha mantenido a lo largo de la evolución de los vertebrados y sugiere que podría tener relevancia en el control de determinados procesos fisiológicos. Recibió el nombre de urocortina debido a su homología con la hormona de los peces teleósteos llamada urotensina y con el CRF de los mamíferos, ya que estos tres péptidos poseen actividades biológicas comunes. La urocortina tiene un 45% de homología con el CRF, un 65% con la urotensina I y un 35% con la sauvagina. El gen de la urocortina consta de 2 exones, con toda la información codificada en el segundo exón (Zhao *et al.*, 1998). El RNAm producido por este gen da lugar a una proteína de 122 aminoácidos que contiene en el extremo terminal una metionina, la cual es degradada por proteólisis hasta dar lugar al péptido activo de 40 aminoácidos.

La urocortina se detecta en varias regiones del cerebro de la rata, tales como el núcleo de Edinger-Westphal, la oliva superior lateral (Vaughan *et al.*, 1995), la sustancia negra, el área tegmental ventral, los núcleos del rafe dorsal y medial (Kozicz *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998) y el hipotálamo (Oki *et al.*, 1998). En el cerebro humano, aparece inmunorreactividad a la urocortina y a su RNAm en todas las regiones exploradas, con mayor concentración en la corteza frontal, corteza temporal e hipotálamo (Takahashi *et al.*, 1998). También se ha detectado a nivel periférico, localizándose su inmunorreactividad en el sistema digestivo y pituitaria de la rata (Oki *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1996) y en la pituitaria humana (Lino *et al.*, 1997). Otros lugares donde existe expresión del RNAm de la urocortina o el propio péptido son células inflamatorias de la mucosa

del tracto gastrointestinal en humanos (Iino *et al.*, 1998) así como en la placenta y las membranas fetales humanas (Petraglia *et al.*, 1996). Los linfocitos normales humanos también producen urocortina pero no CRF (Bamberger *et al.*, 1998). Además de su expresión en regiones del sistema nervioso que potencialmente regulan la función cardiovascular, como son el hipotálamo o el bulbo raquídeo, la urocortina también se expresa en los miocitos cardiacos y esta expresión aumenta en algunas situaciones patológicas como por ejemplo la isquemia coronaria (Nishikimi *et al.*, 2000). Los niveles de urocortina en el plasma humano son relativamente bajos ($\sim 10^{-12}\text{M}$) (Watanabe *et al.*, 1999), pero puesto que este péptido se produce en tejidos periféricos como el miocardio, el cerebro, el timo, el bazo, la piel y el hígado, es probable que los niveles tisulares locales sean más elevados que los plasmáticos, de tal manera que este péptido podría actuar como un regulador paracrino en diferentes funciones, incluida la función cardiovascular.

En cuanto a los receptores sobre los que actúan los péptidos de esta familia se han descrito tres tipos: CRF-R₁, CRF-R₂, CRF-R₃. Los tres pertenecen a la clase B de la subfamilia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a la proteína G (Figura 2).

Al receptor CRF-R₁ de los mamíferos se unen con alta afinidad distintos miembros de esta familia de péptidos; por ejemplo se une la urocortina, el CRF de rata/humano, el CRF ovino, la urotensina I y la sauvagina (Vaughan *et al.*, 1995; Donaldson *et al.*, 1996; Dieterich *et al.*, 1997; Perrin *et al.*, 1999; Dautzenberg *et al.*, 2001). Sólo el receptor CRF-

R₁ de los anfibios discrimina entre el CRF, la urocortina, la urotensina I y la sauvagina al ligarse con diferentes afinidades (Dautzenberg *et al.*, 2001).

El receptor CRF-R₂ muestra, sin embargo, diferente especificidad con respecto al sustrato (Vaughan *et al.*, 1995; Donaldson *et al.*, 1996). A este receptor se une la urocortina con una afinidad 40 veces mayor que el CRF o la urotensina I, por lo cual se ha propuesto a la urocortina como el ligando natural este tipo de receptores.

El receptor CRF-R₃, descrito recientemente, se ha aislado en el pez gato *Ameiurus nebulosus*, y presenta un 85% de homología con el receptor CRF-R₁ y un 80% de homología con el CRF-R₂ (Arai *et al.*, 2001). Todavía no se ha encontrado en humanos un homólogo al receptor CRF-R₃ del pez gato. Este receptor, al cual se une el CRF con 5 veces mayor afinidad que la urotensina I y la sauvagina, se expresa en la glándula pituitaria, urófisis y cerebro de dicho pez (Arai *et al.*, 2001).

La localización de estos tres tipos de receptores varía en función del tipo de receptor y de la especie animal. El RNAm del receptor CRF-R₁ se expresa muy abundantemente en la pituitaria de los mamíferos (Chen *et al.*, 1993; Potter *et al.*, 1994) y en áreas cerebrales tales como la corteza cerebral, cerebelo, amígdala cerebral, hipocampo y bulbos olfatorios (Chen *et al.*, 1993; Chalmers *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 1999). En cambio, el subtipo CRF-R₂ puede estar presente en el sistema nervioso central y en

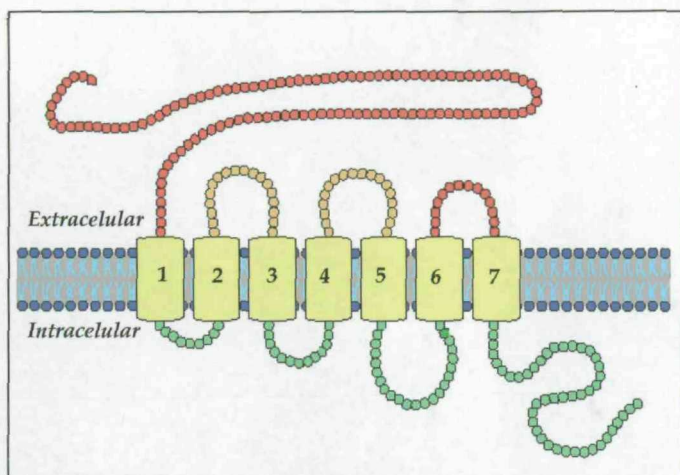


FIGURA 2. Representación esquemática de un receptor CRF.

tejidos periféricos. Este subtipo CRF-R₂ presenta tres variantes conocidas que son: CRF-R_{2α}, CRF-R_{2β}, y CRF-R_{2γ}. En ratas, el subtipo CRF-R_{2α} está localizado principalmente en el cerebro, particularmente en estructuras subcorticales (núcleo septal lateral, hipotálamo ventromedial, pituitaria) (Chalmers *et al.*, 1995). En cambio, en esta especie, el subtipo CRF-R_{2β} predomina en tejidos periféricos, tales como el corazón, tanto en aurículas como ventrículos (en el miocardio, epicardio y arteriolas) (Perrin *et al.*, 1997), tracto gastrointestinal, músculo esquelético, epidídimo, arteriolas cerebrales, pulmón, ovarios y plexos coroideos (Lovenberg *et al.*, 1995; Perrin *et al.*, 1995; Kishimoto *et al.*, 1995; Stenzel *et al.*, 1995; Nozu *et al.*, 1999; Palchadhuri *et al.*, 1999). En contraste con los roedores, en los seres humanos el receptor CRF-R_{2α} se localiza tanto en el cerebro como en tejidos periféricos, mientras que el receptor CRF-R_{2β} se localiza principalmente en el cerebro (Valdenaire *et al.*, 1997; Kostich *et al.*, 1998). El receptor CRF-R_{2γ} se ha encontrado únicamente en el cerebro humano (Sperle *et al.*, 1997; Kostich *et al.*, 1998).

En resumen, el subtipo de receptores CRF-R₁ se expresa predominantemente en el sistema nervioso central, mientras que el subtipo CRF-R₂ abunda en los tejidos periféricos. Puesto que la urocortina tiene una afinidad más elevada que el CRF por el subtipo CRF-R₂, esto explicaría el porqué la urocortina produce unos efectos sistémicos más acentuados que el CRF, y sugiere que la urocortina es el ligando fisiológico de este subtipo de receptores en los tejidos periféricos.

Funciones biológicas de la urocortina:

Desde su descubrimiento en 1995 por Vaughan *et al.*, la urocortina se ha relacionado con multitud de funciones, y se han descrito efectos muy diversos al actuar sobre órganos tan dispares como el cerebro, el sistema inmunológico, el útero o el sistema cardiovascular (corazón y vasos sanguíneos).

Parte de los estudios con urocortina se han centrado en la idea de que esta sustancia debe intervenir en funciones específicas del sistema nervioso relacionadas con la respuesta al estrés, y algunas de estas funciones ya han sido demostradas (véase Skelton *et al.*, 2000). Así, por ejemplo, la urocortina puede intervenir en la supresión del apetito tanto en la rata como en el ratón y puede hacerlo con mayor potencia que el CRF (Spina *et al.*, 1996). De forma similar, la inyección de urocortina aumenta la ansiedad y la actividad, aunque este efecto es menos potente que el producido por el CRF, y se ha especulado que la urocortina podría estar relacionada con la vulnerabilidad a padecer esquizofrenia (Rubinstein, 2000). Debido a la importancia que tiene el vaciado gástrico en la regulación de la ingesta, se han realizado estudios en los que se inyectó urocortina intraperitonealmente y se observó que se reducía el tiempo de vaciamiento gástrico, la ingesta y el peso corporal, todo lo cual se produce de forma más llamativa en los ratones obesos que en los delgados (Asakawa *et al.*, 1999). Estos datos abren nuevas perspectivas sobre su uso en el tratamiento de alteraciones tales como la obesidad o la anorexia nerviosa.

Por otro lado, se ha relacionado tanto al CRF como a la urocortina con la modulación de la respuesta inmunológica al actuar sobre receptores específicos de diferentes poblaciones de células inmunes (macrófagos, linfocitos T, mastocitos) y producir multitud de efectos (activación de células inmunológicas y secreción de distintas sustancias como interleukinas, histamina). También se ha relacionado a la urocortina con la gestación. En este sentido, se ha observado que la urocortina se produce en la hipófisis en la fase final de la gestación en ovinos, y esto contribuiría a la regulación de la liberación de ACTH, sustancia fundamental en el desarrollo del parto (Holloway *et al.*, 2002).

Respecto a los efectos cardiovasculares de la urocortina, se han observado marcadas diferencias según la especie. En ratas, se ha descrito que la inyección intravenosa de urocortina produce un efecto hipotensor muy potente y de larga duración, y con una potencia superior a la del CRF (Vaughan *et al.*, 1995). También incrementa la frecuencia cardíaca, en parte debido a la estimulación de los barorreceptores como consecuencia de la hipotensión. La hipotensión que se produce tras su administración intravenosa probablemente se debe a la vasodilatación periférica, especialmente en el lecho vascular mesentérico, al igual que ocurre con el CRF, la sauvagina y la urotensina (Lenz *et al.*, 1985). Estudios recientes realizados en corazón aislado de rata demuestran que la urocortina también tiene acción inotrópica positiva y reduce la presión de perfusión en la arteria coronaria (Terui *et al.*, 1999). Asimismo, esta acción inotrópica parece estar modulada por las prostaglandinas sintetizadas por la vía de la

ciclooxigenasa, y no se afecta por la inhibición de la producción de óxido nítrico (Terui *et al.*, 1999). La inyección de urocortina en el ventrículo lateral cerebral de ratas produce hipertensión arterial, sin cambiar la contractilidad del miocardio, sugiriendo que la acción inotrópica de este péptido estaría inducida por su acción directa sobre el corazón (Spina *et al.*, 1996). En cambio, en ovejas despiertas (Parkes *et al.*, 1997) la inyección intravenosa de la urocortina produce incremento lento de la presión arterial, lo cual se asocia con aumento de la frecuencia cardíaca y del volumen sistólico, y de forma llamativa se produce también un incremento rápido y potente de la contractilidad cardíaca. Asimismo, estos efectos de la urocortina se acompañan de incremento del flujo sanguíneo coronario, y este aumento podría deberse a un efecto directo del péptido sobre los vasos coronarios o al incremento de la demanda de oxígeno en el corazón como consecuencia del aumento del trabajo del miocardio. Estudios *in vitro* muestran que este péptido produce dilatación de los vasos coronarios de rata por acción directa (Terui *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003).

Con el uso de bloqueantes específicos se ha observado que el α -helical (9-41), antagonista de los receptores CRF-R₂, bloquea los efectos cardiovasculares de la urocortina en ratas, lo que ha llevado a proponer que este subtipo de receptor podría ser el mediador de los efectos sistémicos (cardiovasculares y no cardiovasculares) de la urocortina. Asimismo, los efectos cardiovasculares de la urocortina están abolidos en ratones "knock out" con el gen del receptor CRF-R₂ inactivado. A este respecto, es interesante la observación de que estos ratones "knock out"

presentan hipertensión, lo que sugiere que la urocortina podría intervenir en la regulación de la presión arterial en condiciones normales (Coste *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2000).

Estudios *in vitro* también muestran que la urocortina produce vasodilatación en preparaciones experimentales de placenta humana (Leitch *et al.*, 1998), vena safena humana (Sanz *et al.*, 2002) y en la arteria basilar (Schilling *et al.*, 1998), la arteria caudal (Lubomirov *et al.*, 2001) y la arteria coronaria (Huang *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003) de ratas. Aunque en estos tres lechos vasculares de rata la urocortina produce vasodilatación, el mecanismo de acción en esta vasodilatación difiere según el lecho vascular. En la arteria basilar la vasodilatación es independiente de endotelio y se produce por estimulación de la adenilato ciclasa y de los canales de potasio dependientes de calcio (Schilling *et al.*, 1998). En el caso de la arteria caudal la vasodilatación también es independiente de endotelio pero podría estar producida por la disminución de la sensibilidad del sistema contráctil del músculo liso al calcio (Lubomirov *et al.*, 2001). En la arteria coronaria la vasodilatación es dependiente e independiente de endotelio y está mediada por el óxido nítrico y por activación de canales de potasio (Huang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003). Estos estudios indican que los efectos vasculares de la urocortina pueden diferir según la especie, y por este motivo la extrapolación de los resultados en animales a la especie humana debe hacerse con precaución. Los estudios en vasos humanos son muy escasos. En la placenta humana perfundida *in vitro* (Leitch *et al.*, 1998) se

observó que la urocortina produce vasodilatación dependiente de la dosis, y esta vasodilatación se inhibe con antagonistas de los receptores CRF-R₂, sugiriendo que la urocortina podría modular el tono vascular de la placenta humana a través de la activación de receptores CRF-R₂. En la vena safena humana (Sanz *et al.*, 2002) la urocortina también produce relajación dependiente de la dosis, y esta venodilatación es independiente de óxido nítrico, está mediada por la activación de canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia, y esta modulada por prostanoïdes vasoconstrictores, sugiriendo que la urocortina podría estar involucrada en la regulación de la circulación sanguínea en humanos en condiciones fisiológicas y/o patológicas.

Además de los efectos cardiovasculares descritos anteriormente, la urocortina parece ejercer un efecto protector frente al daño producido por la isquemia/reperfusión tanto en las células cardíacas en cultivo como en el corazón intacto (Okosi *et al.*, 1998; Brar *et al.*, 1999; Brar *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001; Scarabelli *et al.*, 2002; Railson *et al.*, 2002; Brar *et al.*, 2002). Estos efectos protectores de la urocortina parecen producirse por la activación de la vía PI-3/Akt y de la vía p42/p44 protein kinasas activadas por mitógenos (Latchman, 2001; Brar *et al.*, 2000; Brar *et al.*, 2002). Además, la urocortina estimula la secreción de péptido natriurético auricular y cerebral en cultivos de cardiomiocitos de rata mediante activación de receptores CRF-R₂ (Ikeda *et al.*, 1998). Los mecanismos por los que la urocortina reduce la muerte celular inducida por la hipoxia no están bien definidos todavía, pero el efecto protector de este péptido en el

corazón frente a los efectos dañinos de la isquemia/reperfusión podría tener una importancia médica considerable (Latchman, 2001). Este efecto beneficioso se produce incluso cuando este péptido se utiliza después del periodo isquémico, durante el proceso de reperfusión (Brar *et al.*, 2000). Por tanto, la urocortina se podría administrar en pacientes tras haber sufrido un episodio isquémico cardiaco en el momento de la restauración del flujo sanguíneo para aminorar el efecto dañino de la reperfusión. Desafortunadamente, se ha observado que la urocortina también puede producir hipertrofia del miocardio por el incremento de la síntesis proteica y por la expresión de péptidos específicos como el péptido natriurético auricular (Nishikimi *et al.*, 2000). Esto último hace desvanecer la idea de utilizar la urocortina como tratamiento preventivo en pacientes con riesgo de padecer cardiopatía isquémica.

Resumiendo, la urocortina es un péptido recientemente descubierto, no es un “vestigio en la escala evolutiva animal” puesto que está presente en el plasma de los seres humanos y podía estar implicada en diversas funciones fisiológicas, las cuales aún no son bien conocidas. Uno de sus efectos más conocidos es su acción vasodilatadora, por lo cual y debido a su presencia en el plasma de humanos parece lógico que este péptido haya despertado el interés de los investigadores por conocer su posible papel en la regulación del sistema cardiovascular. Esto constituye el principal objetivo de nuestro trabajo. Los estudios realizados hasta la fecha para conocer los efectos vasculares de la urocortina y sus mecanismos de acción son todavía escasos. En este sentido, podría ser de interés conocer

sus efectos vasculares en condiciones normales, la influencia del sexo y la repercusión de situaciones patológicas frecuentes y de elevado riesgo cardiovascular como es el caso de la diabetes mellitus. Por todo ello, consideramos justificado el estudio propuesto en el presente trabajo.

2. FUNCIÓN VASCULAR

Los vasos sanguíneos y el corazón constituyen el sistema cardiovascular, cuya función principal es regular la presión arterial y el flujo sanguíneo tisular. Para llevar a cabo esta función, los vasos sanguíneos (especialmente las arterias) tienen la capacidad de producir un tono basal y de contraerse (vasoconstricción) o relajarse (vasodilatación), cambiando así la resistencia vascular. La pared vascular tiene tres capas: externa (adventicia), media (músculo liso) e íntima (endotelio). La capa media o músculo liso es el órgano efector de la pared vascular y está expuesta a estímulos nerviosos (inervación vascular), químicos (sustancias que circulan en el plasma o son liberadas por el endotelio) y mecánicos (presión arterial, flujo sanguíneo). Estos estímulos pueden producir vasodilatación o vasoconstricción.

La función vascular depende del estado del endotelio, es influenciada por el sexo y se altera durante la diabetes mellitus. Estos aspectos son comentados a continuación.

a) El endotelio y la función vascular

El endotelio es la capa monocelular de la pared vascular que está en contacto directo con la sangre circulante, y sirve de barrera que evita el paso de agentes plasmáticos nocivos hacia el interior de la pared vascular. Sin embargo, el endotelio no es simplemente una barrera física que separa la pared vascular de la sangre circulante, sino que es un "órgano" muy activo con funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas. El endotelio constituye un elemento clave en la homeostasis cardiovascular y tiene función antitrombótica, interviene en las respuestas inflamatorias e inmunológicas, interviene en la angiogénesis y lleva a cabo la captación y metabolismo de la 5-hidoxitriptamina (5-HT) y de la noradrenalina circulantes, la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, el metabolismo de la bradiquinina, así como la inhibición de la liberación de noradrenalina en las terminaciones nerviosas adrenérgicas (Cohen y Weisbrod, 1988).

Como se ha dicho anteriormente, el endotelio cumple un papel protagonista en la regulación del tono y de la respuesta vascular. Esta estructura es sensible a estímulos nerviosos, humorales y mecánicos intravasculares, los cuales aumentan o disminuyen la secreción endotelial de sustancias vasoconstrictoras (radicales libres, endotelina-1 o tromboxano A_2) y sustancias vasodilatadoras (óxido nítrico, prostaciclina o factor hiperpolarizante derivado de endotelio) y a través de las cuales el endotelio modifica el tono y la respuesta vascular.

El óxido nítrico tiene un papel muy destacado en la regulación del tono vascular (Moncada *et al.*, 1999). Esta sustancia se sintetiza a partir de la L-arginina por acción de la sintasa del óxido nítrico y participación de determinados cofactores, y se libera en el endotelio. Esta liberación aumenta al estimular el endotelio con acetilcolina u otras sustancias, o al aumentar el flujo sanguíneo activando la sintasa del óxido nítrico. El óxido nítrico produce vasodilatación a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble, incrementando del GMPc intracelular; el GMPc modifica el estado de fosforilación de determinadas enzimas y, además, produce la activación de la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico disminuyendo la concentración de calcio en el citoplasma, inhibiendo así la contracción. La producción basal de óxido nítrico varía de unos vasos sanguíneos a otros y también varía según el sexo; los vasos sanguíneos de las hembras por efectos de los estrógenos tienen una mayor producción de óxido nítrico que los de los machos (Mendelsohn & Karas, 1994).

Los prostanoideos son metabolitos derivados del ácido araquidónico por acción de la ciclooxigenasa, y entre ellos se incluyen la PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂ y tromboxano A₂. La PGI₂ o prostaciclina se forma principalmente en la íntima de los vasos, actúa sobre receptores específicos del músculo liso vascular produciendo vasodilatación. Esta vasodilatación se debe a que la prostaciclina aumenta el AMPc, el cual a su vez incrementa la protein kinasa A que es la inductora de la relajación porque disminuye el calcio citoplasmático al incrementar la captación de calcio en el retículo sarcoplásmico. Los endoperóxidos y el tromboxano A₂

se unen a receptores específicos en el músculo liso vascular produciendo vasoconstricción por un incremento del inositol trifosfato (IP_3), el cual desencadena la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y en consecuencia se produce la contracción del músculo liso vascular, aunque también pueden estar implicados otros mecanismos (Auch-Schwelk *et al.*, 1990). Existen situaciones patológicas como la diabetes en las que aumenta la producción de estos prostanoïdes vasoconstrictores en el endotelio vascular.

Otra de las sustancias producidas por el endotelio y que interviene en la regulación del tono vascular es el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EHDF). No se conoce la naturaleza de este factor, aunque se sospecha que es un derivado del ácido araquidónico. Este ácido a través de la vía del citocromo P-450 oxidasa produce ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), los cuales inducen hiperpolarización del músculo liso vascular por activación de determinados canales de potasio, principalmente canales de K^+ dependientes de calcio. (Vanheel *et al.*, 2000).

El papel del endotelio y de las sustancias que éste produce en los efectos vasculares de la urocortina no se conocen y su estudio constituye uno de los objetivos de este trabajo.

b) El sexo y la función vascular

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en el conjunto de la población española. En 1998 causaron 134.512 muertes (61.189 varones y 73.323 mujeres), lo que supone el 37% de

todas las defunciones (32% varones y 43% mujeres) (Villar Álvarez *et al.*, 1998). Por su frecuencia y morbi-mortalidad las dos principales enfermedades cardiovasculares son la enfermedad isquémica cardíaca y la enfermedad cerebrovascular, que en conjunto producen cerca del 60% de la mortalidad debida a todas las enfermedades cardiovasculares. Actualmente en España la enfermedad isquémica cardíaca es la que ocasiona un mayor número de muertes secundarias o alteraciones cardiovasculares (30% en total: 38% en varones y 24% en mujeres).

La incidencia de enfermedades cardiovasculares difiere de forma significativa entre hombres y mujeres, lo cual es debido, en parte, a los diferentes factores de riesgo y al efecto de las hormonas sexuales (Barrett-Connor, 1997). Las mujeres presentan una mayor protección frente a las enfermedades cardiovasculares antes de la menopausia, aunque una vez llegada a ella aumenta progresivamente el riesgo cardiovascular hasta igualarse con los hombres (Barrett-Connor & Bush, 1991). Tanto los datos experimentales como clínicos sugieren que este incremento en las mujeres sucede porque en la menopausia disminuyen los estrógenos y se pierde su efecto protector. La incidencia de aterosclerosis es menor en mujeres premenopáusicas, comparado con las postmenopáusicas, y se reduce en el caso de las mujeres postmenopáusicas a los niveles de las premenopáusicas cuando aquellas reciben terapia estrogénica. Estudios epidemiológicos muestran que las mujeres postmenopáusicas que reciben terapia estrogénica experimentan una disminución de un 50% en la aparición de lesiones isquémicas cardíacas (Stampfer *et al.*, 1991; Grady

et al., 1992). Estas observaciones indican que los estrógenos juegan un papel relevante en la prevención de la enfermedad cardiovascular.

Inicialmente se asoció a los estrógenos con un efecto ateroprotector ya que reducen el riesgo de desarrollar placas ateromatosas porque modifican el perfil lipídico plasmático, disminuyendo los niveles de LDL y aumentando los de HDL. Sin embargo, las modificaciones en el perfil lipídico sérico inducidas por los estrógenos sólo son responsables de, aproximadamente, un tercio de sus beneficios clínicos (Grady *et al.*, 1992; Bush *et al.*, 1987), por lo que se ha propuesto que los estrógenos tendrían otras acciones, como por ejemplo un efecto directo sobre los vasos sanguíneos. En efecto, los estrógenos parecen modificar directamente las funciones del endotelio y del músculo liso vascular. La vasodilatación inducida por los estrógenos se produce 5 a 20 minutos después de la administración de los estrógenos y no depende de la expresión de genes, por lo que esta acción es llamada "no genómica" (Mendelsohn & Karas, 1999). Además, los estrógenos inhiben la respuesta al daño vascular y tienen un efecto preventivo contra la aterosclerosis cuando el tratamiento con estrógenos se produce durante horas o días; esta acción depende de cambios en la expresión genética en los tejidos vasculares y se llama "genómica". Los estrógenos modulan la síntesis y la liberación de factores vasodilatadores (especialmente el óxido nítrico) y factores vasoconstrictores (Mendelsohn & Karas, 1999).

Existen varios estudios donde se demuestra la influencia de las hormonas sexuales en la síntesis de óxido nítrico endotelial, y se han

observado diferencias en el papel del endotelio en la regulación del tono vascular en función del sexo (Maddox *et al.*, 1987; Stallone *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1992; Kauser & Rubanyi, 1994). Así, en las hembras el endotelio vascular produce más óxido nítrico que en los machos, lo cual se ha asociado con las hormonas sexuales femeninas, concretamente con el estradiol-17 β (Hayashi *et al.*, 1992; Gisclard *et al.*, 1988; Kauser & Rubanyi, 1995). Uno de los posibles mecanismos por los que el estradiol-17 β estimularía la síntesis de óxido nítrico sería a través del incremento en la expresión del gen de la sintasa del óxido nítrico, el enzima NOS-III (Weiner *et al.*, 1994; Goetz *et al.*, 1994), y también a través del incremento en la actividad del enzima mediante un aumento en la disponibilidad de L-arginina, sustrato necesario para la síntesis de óxido nítrico ya que los estrógenos regulan los niveles circulantes de L-arginina (Hayashi *et al.*, 1995). El incremento en la actividad de la enzima NOS-III se produce por una mayor biodisponibilidad del sustrato, la L-arginina, y de los cofactores (tetrahidrobiopterina, calmodulina, niveles de calcio intracelular). Por otro lado, los estrógenos podrían interferir en la biodegradación del óxido nítrico al reducir la formación de radicales oxidantes (Rubanyi & Vanhoutte, 1986).

La influencia del sexo en los efectos vasculares de la urocortina no ha sido estudiada, y el análisis de esa influencia constituye otro de los objetivos de nuestro trabajo.

c) La diabetes mellitus y la función vascular

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Fact sheet nº138,1999), la diabetes mellitus es una enfermedad crónica, causada por un déficit, heredado o adquirido, en la producción pancreática de insulina o por una falta de respuesta tisular a esta hormona. Esta deficiencia provoca un aumento de la concentración plasmática de glucosa, lo cual a su vez produce daño en muchos sistemas orgánicos, especialmente en los vasos sanguíneos y nervios periféricos.

La diabetes constituye un importante problema de salud pública en el ámbito mundial, y este problema está adquiriendo grandes proporciones en los últimos años. Según datos de la OMS, mientras que en el año 1985 existían en el mundo unos 30 millones de diabéticos, actualmente ya son 150 millones, y se estima que para el año 2025 llegarán a ser 300 millones. En España existen actualmente unos 2,3 millones de diabéticos y la cifra estimada para el año 2025 es de unos 3 millones de enfermos. Tradicionalmente la diabetes mellitus se clasifica en dos grandes tipos: 1) diabetes tipo 1, clásicamente conocida como diabetes dependiente de insulina, también llamada diabetes de inicio juvenil, y 2) diabetes tipo 2, clásicamente denominada diabetes no dependiente de insulina. En ambos casos las alteraciones metabólicas parecen ser causadas por una falta relativa o absoluta de insulina acompañada de un exceso relativo o absoluto de glucagón (WHO Study Group, 1985).

La importancia de la diabetes está relacionada con las complicaciones crónicas asociadas a la misma, principalmente la

retinopatía, la nefropatía, la enfermedad coronaria, la neuropatía y la isquemia periférica. Las enfermedades cardiovasculares que se originan a partir de la macroangiopatía diabética, provocan el 75% de las muertes de los pacientes diabéticos en países industrializados. Por otra parte, la diabetes es la principal causa de fallo renal, siendo la nefropatía la principal causa de muerte en la población diabética insulino-dependiente. Las alteraciones vasculares constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes diabéticos (Stamler *et al.*, 1993). Estos pacientes parecen ser particularmente propensos a sufrir alteraciones en el sistema cardiovascular, y en éstos la mortalidad debida a enfermedades cardiovasculares es tres veces más elevada que en la población no diabética (Jarret, 1989). Las alteraciones vasculares que aparecen en el curso de la diabetes mellitus (macroangiopatía y microangiopatía) afectan tanto a la estructura como a la función de los vasos sanguíneos. Con respecto a la función, la diabetes puede alterar el tono y la respuesta vascular, lo cual contribuye al desarrollo de complicaciones tales como el fallo cardíaco, los accidentes vasculares cerebrales, la hipertensión, la retinopatía, la neuropatía y la nefropatía (García *et al.*, 1974; Crepaldi y Nosadini, 1988; Kastrup, 1988; Jarret, 1989).

Disfunción endotelial en la diabetes mellitus. Mientras que se acepta que la diabetes mellitus está asociada con una aterosclerosis acelerada y con el incremento de la prevalencia de la enfermedad cardiovascular, los efectos de la diabetes sobre el sistema cardiovascular no están totalmente esclarecidos. En el estudio de los efectos vasculares de la diabetes,

destaca el interés dirigido a conocer la lesión del endotelio y la alteración de su función como factores desencadenantes de las complicaciones vasculares de la diabetes. Como se ha indicado con anterioridad, el endotelio regula el tono y la respuesta vascular mediante la producción de sustancias vasoactivas, por lo que la diabetes mellitus al alterar el endotelio puede provocar cambios en la respuesta vascular frente a estímulos vasoconstrictores y vasodilatadores. Las alteraciones en la respuesta vascular durante la diabetes mellitus se han observado tanto en preparaciones experimentales *in vitro* como *in vivo*, y podrían ser debidas a la alteración del endotelio y/o de la respuesta del músculo liso vascular (García-Villalón *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2003a, 2003b; Loichot *et al.*, 2001; Ang *et al.*, 2001; Ozyazgan *et al.*, 2000; Given *et al.*, 2001; Sotnikova *et al.*, 1999).

El óxido nítrico es uno de los principales mediadores de la vasodilatación dependiente de endotelio, por lo que muchos de los estudios se han dirigido a analizar el papel de esta sustancia en los efectos de la diabetes sobre la función vascular. Se ha sugerido que la diabetes podría afectar la función del óxido nítrico a tres niveles: 1) modificando la síntesis de óxido nítrico en las células endoteliales; 2) disminuyendo la biodisponibilidad del óxido nítrico una vez liberado, como consecuencia de su inactivación por productos derivados de la glicosilación avanzada o por radicales libres; 3) modificando la sensibilidad del "receptor", es decir, de la guanilato ciclasa de la célula muscular lisa vascular (Chan *et al.*, 2000). A este respecto, los resultados disponibles muestran grandes discrepancias.

Dada la importancia del endotelio en la regulación de la función vascular y en los efectos perniciosos de la diabetes sobre los vasos sanguíneos, se considera un tema prioritario el estudio de cómo afecta la diabetes la función vascular general, y la función endotelial en particular. Este tipo de estudios contribuirán a conocer la fisiopatología de la vasculopatía diabética y de sus complicaciones.

Diabetes mellitus, sexo y función vascular. Es llamativo que las mujeres diabéticas de cualquier edad son más propensas a padecer enfermedades cardiovasculares que los hombres diabéticos (Goldschmid *et al.*, 1994; Seeman *et al.*, 1993). Estas observaciones sugieren que las diferencias sexuales en la incidencia de la disfunción vascular y en las enfermedades cardiovasculares están disminuidas durante la diabetes (García *et al.*, 1974; Sowers, 1998), sugiriendo que la diabetes eliminaría las "ventajas" que presentan las mujeres premenopáusicas frente a los hombres con respecto a la incidencia de las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, la muerte por infarto de miocardio es significativamente superior en las mujeres diabéticas que en las mujeres no diabéticas o que en los hombres diabéticos o no (Sowers, 1998). Asimismo, Bolego *et al.* (1999), observaron que el tratamiento de ratas diabéticas con estrógenos mejoraba la vasodilatación dependiente de óxido nítrico. De forma similar, existen estudios realizados en vasos sanguíneos periféricos humanos (Lim *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 2000) y en arteria basilar de rata (Mayhan *et al.*, 2002) en los que se observa que la diabetes anula las diferencias sexuales en la vasodilatación dependiente de óxido nítrico.

Otros estudios informan que la diabetes suprime las diferencias sexuales en la potenciación mediada por vasopresina durante la vasoconstricción producida por la activación simpática en la arteria caudal de rata (Sanz *et al.*, 2001).

Modelos experimentales de diabetes. Los modelos experimentales de diabetes en animales son en la actualidad una herramienta de gran valor para el estudio de los mecanismos involucrados en los diferentes tipos de complicaciones a largo plazo de la diabetes, y las características generales de la diabetes experimentales son similares a las de la diabetes humana. Los diferentes modelos experimentales utilizados en distintas especies animales se pueden agrupar en cuatro grandes grupos según la metodología usada para inducir la diabetes: a) modelos que utilizan agentes químicos (diabetes química); b) modelos en los que se induce mediante procedimientos quirúrgicos (diabetes quirúrgica); c) modelos en los que se induce con infecciones víricas (diabetes vírica); y d) modelos de diabetes espontánea.

A partir del descubrimiento del origen pancreático de la diabetes mellitus por Oskar Minkowski en 1889, se han desarrollado modelos experimentales de diabetes quirúrgica consistentes en la realización de una pancreatectomía total o parcial que desencadena estados hiperglucémicos parecidos a una diabetes mellitus dependiente de insulina y diabetes mellitus no dependiente de insulina, respectivamente (Ingle, 1948). Los modelos de pancreatectomía o diabetes quirúrgica sólo tienen en la actualidad una importancia histórica. Por otro lado, la infección viral se

señala como una causa de diabetes tanto en animales como en humanos (Craighead, 1975; Barret-Connor, 1985). La susceptibilidad genética frente a la infección y la resistencia de las células β -pancreáticas a las lesiones virales son puntos que no están totalmente aclarados todavía (Öztürk *et al.*, 1996). En cuanto a los animales espontáneamente diabéticos, las especies más utilizadas son las ratas Wistar BB, los hamsters chinos y los ratones OB. En el caso de las ratas Wistar BB el síndrome desarrollado tiene características de la diabetes mellitus dependiente de insulina y en el de los ratones OB es similar al de la diabetes mellitus no dependiente de insulina (Öztürk *et al.*, 1996).

Respecto a la diabetes química, que es la usada en nuestra investigación, se ha demostrado que la administración de ciertas sustancias en animales provoca situaciones experimentales similares a la diabetes humana. Entre estas sustancias, la estreptozotocina y el aloxano parecen ser los más específicos y son los más comúnmente usados. Ambas sustancias actúan destruyendo las células β -pancreáticas por lo que provocarían una diabetes mellitus dependiente de insulina y la falta total de secreción de insulina, necesitando administrar dicha hormona a estos animales para lograr su supervivencia. Sin embargo, aunque los niveles de insulina en estos animales son muy bajos, no hay ausencia total de la misma y pueden sobrevivir durante meses sin ser tratados con insulina (Bell y Hye, 1983). La capacidad de la estreptozotocina para destruir selectivamente las células β -pancreáticas fue descrita por primera

vez por Rakietyen y sus colaboradores (1963), quienes demostraron que esta sustancia inyectada por vía intravenosa producía diabetes en ratas y perros. Por su parte, Dunn y colaboradores (1943) fueron los primeros en describir la destrucción de las células β -pancreáticas por el aloxano. A pesar de las evidencias existentes de su acción tóxica directa sobre dichas células, no se conoce todavía el mecanismo exacto de la toxicidad de estos dos fármacos. Parece ser que, en ambos casos, el efecto tóxico estaría relacionado con alteraciones morfológicas y con el aumento de la permeabilidad de la membrana de las células β -pancreáticas (Weaver *et al.*, 1978; Bell y Hye, 1983). Tanto la estreptozotocina como el aloxano producen diabetes mellitus dependiente de insulina en un elevado número de especies, y curiosamente el cobaya es insensible a ambos fármacos (Bailey, 1949; Bell y Hye, 1983). Los animales tratados tanto con estreptozotocina como con aloxano presentan la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes: cardiomiopatía, neuropatía, disfunción arterial coronaria, alteraciones hepáticas, etc. (Öztürk *et al.*, 1996).

Hasta este momento no se han estudiado los efectos de la diabetes sobre la respuesta vascular a la urocortina. Este tipo de estudio constituye otro de los objetivos de este trabajo, en el que se induce diabetes con estreptozotocina en ratas Sprague-Dawley machos y hembras. El uso de animales de laboratorio nos permite comparar animales de igual edad y peso, evitando que estos dos factores influyan en los resultados. Otro

aspecto importante es que este modelo permite controlar el tiempo de duración de la diabetes.

OBJETIVOS

Diversos estudios sugieren que la urocortina podría tener un papel relevante en la regulación del sistema cardiovascular en condiciones normales y en ciertas situaciones patológicas. Sin embargo, el estudio de los efectos vasculares de este péptido y de sus mecanismos de acción es todavía incompleto, y se desconoce la influencia del sexo y la acción de la diabetes mellitus sobre esos efectos. Por ese motivo, el objetivo de este trabajo es analizar los efectos de la urocortina en distintos lechos vasculares (cerebral, coronario, renal y cutáneo), explorando algunos de los posibles mecanismos de acción, la influencia del sexo y la repercusión de la diabetes mellitus en esos efectos. La elección de los vasos cerebrales, coronarios y renales se debe a que son la diana más frecuente de las complicaciones vasculares diabéticas, y las arterias cutáneas se eligieron para tener un testigo con el que comparar los resultados obtenidos en los otros tres lechos vasculares. Los vasos sanguíneos se extrajeron de ratas hembras y machos normoglucémicos y con diabetes inducida con estreptozotocina.

Para ello se realizarán experimentos con el fin de estudiar:

1.- Los efectos que produce la urocortina en diferentes lechos vasculares (cerebral, coronario, renal y cutáneo).

2.- La influencia del sexo y algunos de los posibles mecanismos implicados en la vasodilatación producida por la urocortina. Concretamente

se estudiará el papel del óxido nítrico, de los prostanoïdes vasoconstrictores o vasodilatadores, de los canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio, de la adenilato ciclasa, de la adenosina difosfato ribosa cíclica, de la protein kinasa A, del calcio intracelular, y de los receptores del factor de liberación de la corticotropina (CRF).

3.- La acción de la diabetes experimental sobre la vasodilatación producida por la urocortina, examinando el papel del óxido nítrico, de los canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio y de los prostanoïdes en esa acción.

Con este estudio se pretende aportar bases experimentales para contribuir al conocimiento del papel de la urocortina en la regulación cardiovascular, así como al conocimiento de la influencia del sexo y de la repercusión de la diabetes en los efectos vasculares de este péptido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios se llevaron a cabo en segmentos cilíndricos de las siguientes tipos de arterias: basilar (cerebral), coronaria, renal y caudal (cutánea). Estas arterias fueron obtenidas de ratas Sprague-Dawley (Hsd: Sprague- Dawley) de 2-3 meses de edad. Para estudiar la influencia del sexo y los efectos de la diabetes sobre la respuesta vascular, se utilizaron ratas machos y hembras y estas se dividieron en dos grupos. En un grupo de machos y hembras se indujo diabetes experimental mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina, constituyendo así el grupo diabético, y en otro grupo de ratas machos y hembras no se realizó ninguna manipulación experimental y constituye el grupo normoglucémico. Los animales de ambos grupos fueron estabulados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (Nº de Registro EX/021/U) donde recibían los cuidados veterinarios adecuados. La alimentación se realizó con pienso en tacos (A04 PanLab) y agua *ad libitum* hasta el momento de ser sacrificados. En el caso de los animales diabéticos, éstos se estabularon en jaulas especiales con fondo de rejilla.

En total se utilizaron 79 ratas: 34 ratas machos (28 normoglucémicas y 6 diabéticas) y 45 ratas hembras (29 normoglucémicas y 16 diabéticas)

Esta investigación se realizó de acuerdo con la directiva 609/CEE y R.D. 223/88 de 14 de marzo sobre protección de los animales de experimentación con fines científicos, y fue autorizada por el Comité Local de Investigación Experimental.

1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

La inducción de la diabetes se realizó mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina en una dosis de 60 mg/kg, disuelta en buffer citrato pH 4.5, en las ratas Sprague-Dawley machos y hembras. La glucemia se midió usando un medidor de glucosa en sangre (Glucometer elite®), el cual se basa en una tecnología de sensor por electrodo. La medición de la glucemia se realizó inmediatamente antes y dos días después de la inyección de estreptozotocina, así como el día en que se sacrificaron los animales. El aumento de la glucemia (diabetes) aparecía a los dos días de la inyección de estreptozotocina. En las ratas hembras también se comprobó la fase del ciclo estral el día del experimento mediante la observación al microscopio de un frotis vaginal. Como animales controles se usaron ratas a las que sólo se las había inyectado por vía intraperitoneal el vehículo de la estreptozotocina, y se mantuvieron durante el mismo periodo de tiempo que las ratas diabéticas.

La Figura 3 muestra esquemáticamente los grupos de animales machos y hembras sometidos o no al tratamiento con estreptozotocina para inducir la diabetes experimental.

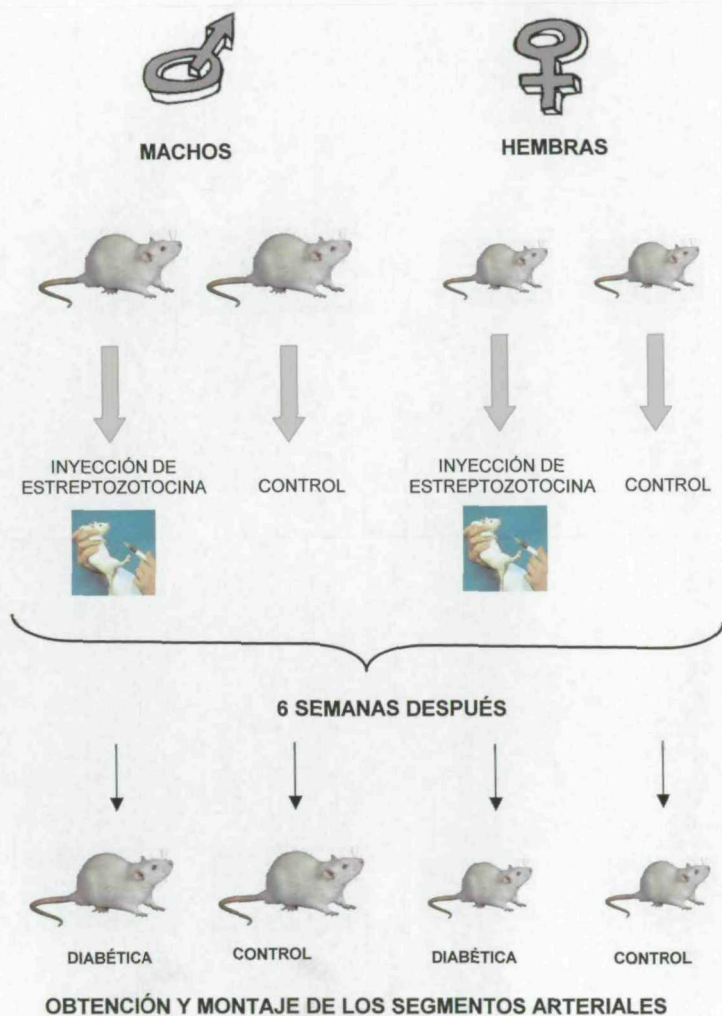


FIGURA 3. Grupos experimentales de animales normoglucémicos y diabéticos.

2. OBTENCIÓN Y MONTAJE DE LOS SEGMENTOS

ARTERIALES

Los animales se sacrificaron 6 semanas después de la inyección intraperitoneal de estreptozotocina o del vehículo. El sacrificio se realizó mediante una sobredosis de pentobarbital (200 mg/kg), inyectada por vía intraperitoneal, seguida del sangrado. Posteriormente se procedía a la extracción del encéfalo, corazón, y riñones, y en estos órganos se practicaba la disección cuidadosa de las arterias basilar, coronaria descendente anterior y renal; la arteria caudal se extraía de la cola (Figura 4). Estas arterias se depositaban en una placa de Petri que contenía suero salino frío, y esta placa era colocada sobre hielo. En esta placa y con ayuda de una lente binocular Zeiss Stemi SR, las arterias se cortaban en segmentos cilíndricos de 2 mm de longitud.

3. REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA

Para el registro de la tensión isométrica desarrollada por la pared de los segmentos arteriales, se introducía a través de la luz vascular dos alambres de tungsteno de 75 μm de diámetro en el caso de las arterias basilar y coronaria, y alambres de acero inoxidable de 100 μm de diámetro en el caso de las arterias renales y caudales. Uno de los alambres quedaba unido a un soporte fijado a la pared del baño de órganos, y el otro alambre que es móvil se conectaba a un transductor para el registro de la tensión isométrica (Universal Transducing Cell

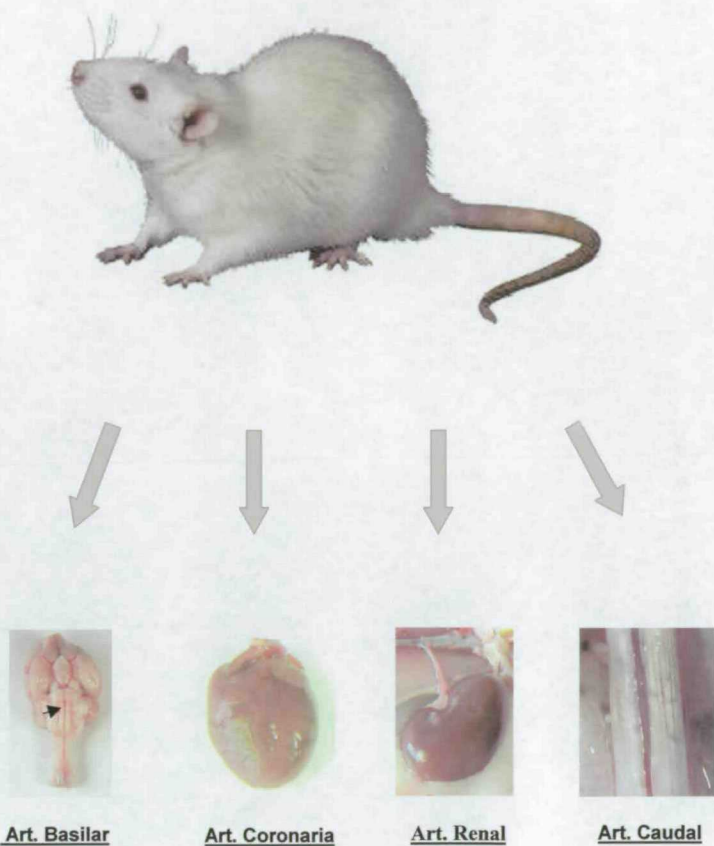


FIGURA 4. Tipos de arterias utilizados en nuestro estudio.

Statham microscale accessory UL5). Un tornillo micrométrico, conectado al alambre móvil, permitía desplazar este alambre verticalmente en sentido perpendicular al eje mayor del segmento arterial y aplicar la tensión pasiva deseada a la pared arterial. El registro de la tensión se realizaba en un ordenador Macintosh, mediante un sistema de adquisición de datos MacIab 8/e (ADInstruments) con el programa Chart v 3.4/s. (Figura 5).

Cada segmento arterial, montado en el sistema explicado anteriormente, se colocaba en el baño de órganos que contenía 4 ml de solución Krebs-Henseleit, cuya composición es la siguiente (mM): NaCl 115; KCl 4.6; KH_2PO_4 1.2; MgSO_4 1.2; CaCl_2 2.5; NaHCO_3 25; glucosa 11. Esta solución se equilibraba con una mezcla gaseosa (95% O_2 y 5% CO_2) para proporcionarle un pH 7.3-7.4 que se comprobó con un pH-metro de laboratorio, modelo Crison. Un circuito de agua caliente que rodea al baño permitía mantener la solución de Krebs-Henseleit junto con los segmentos vasculares a una temperatura de $37 \pm 0,5$ °C.

4. DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN PASIVA ÓPTIMA

Antes de analizar la respuesta de los segmentos arteriales a la urocortina, se procedió a determinar la tensión basal óptima en un grupo de experimentos preliminares. Para ello, se registró la contracción producida por un determinado vasoconstrictor después de exponer los anillos arteriales a diversas tensiones pasivas. En el caso de las arterias renal y caudal se usó como vasoconstrictor KCl (60 mM), y aplicamos a

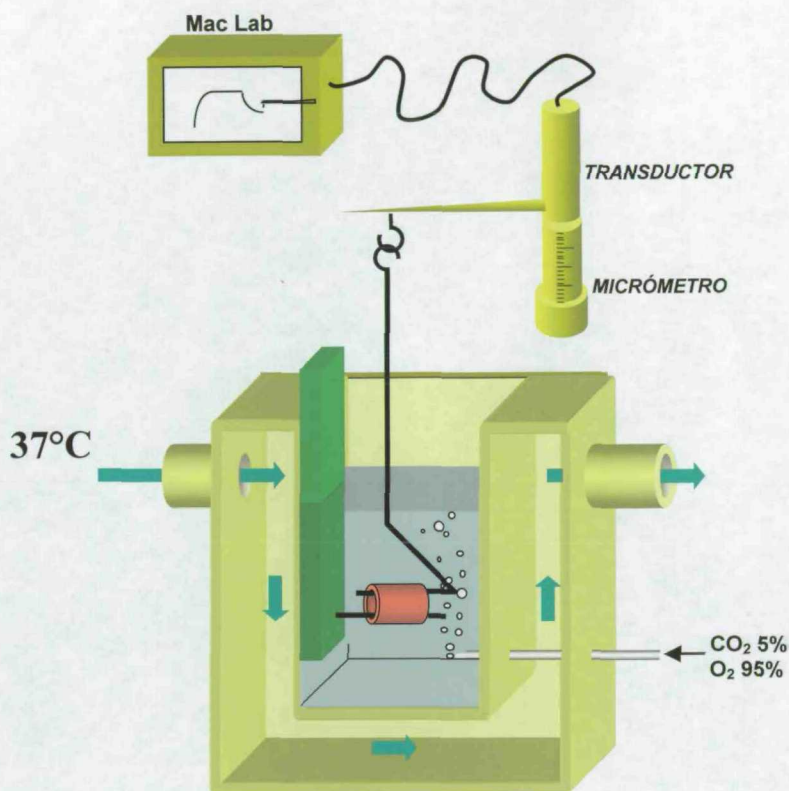


FIGURA 5. Representación esquemática del montaje experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica.

las arterias las tensiones de 50 mg, 100 mg, 250 mg, 500 mg, 750 mg, 1 g, y 2 g. En el caso de las arterias basilar y coronaria se usó como vasoconstrictor 5-HT (10^{-5} M) ya que estas arterias se contraían poco en respuesta a la estimulación con KCl, y se aplicaba a estas arterias las tensiones de 50 mg, 100 mg, 250 mg, 500 mg, 750 mg, 1 g y 2 g. En las arterias basilar y coronaria la respuesta máxima a la 5-HT (10^{-5} M) se observó cuando eran expuestas a una tensión pasiva de 250 mg, y en las arterias renales y caudales la respuesta máxima al KCl (60 mM) se observó a la tensión pasiva de 750 mg. En consecuencia, se tomaron estas tensiones como la tensión pasiva óptima en las arterias basilares y coronarias o caudales y renales, respectivamente, para estudiar la respuesta a la urocortina. Para aplicar la tensión pasiva óptima, los segmentos se distendieron separando los alambres mediante el tornillo micrométrico, y la tensión se reajustaba periódicamente hasta que se estabilizaba a la tensión pasiva deseada. Este periodo de ajuste duraba 60-90 minutos.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Una vez equilibrados los segmentos vasculares a la tensión pasiva óptima se realizaron curvas de concentración-respuesta acumulativas para la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M). Estas curvas se realizaron en las arterias en dos condiciones: a tensión basal de reposo y con tono activo inducido con endotelina-1. Las curvas a tensión basal se realizaron tras equilibrar los segmentos vasculares a la tensión pasiva óptima, para

analizar si la urocortina tenía algún efecto contráctil. Las curvas de concentración-respuesta en las arterias con tono activo inducido con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M) se realizaban para analizar si la urocortina producía vasodilatación. En este caso, tras añadir endotelina-1 al baño, se esperaba unos 10-15 minutos hasta que la contracción arterial alcanzara un nivel estable, y después se procedía a registrar los efectos de la urocortina.

Como la urocortina no produjo ningún efecto en las arterias a tensión basal, y sí produjo vasodilatación en las arterias con tono activo, sólo se estudiaron los mecanismos implicados en esta vasodilatación. Asimismo, como de los cuatro lechos vasculares estudiados sólo las arterias renales mostraron diferencias en la respuesta a la urocortina entre las ratas hembras y machos diabéticas supusimos que debían existir diferencias en los mecanismos de acción de este péptido en función del sexo, por lo que los mecanismos de la vasodilatación se estudiaron sólo en arterias renales.

Para analizar la influencia del sexo en la respuesta vascular a la urocortina, se examinó el papel del óxido nítrico, de los prostanoides, de los canales de potasio, del AMPc, de la protein kinasa A, del calcio intracelular, de la adenosina difosfato ribosa cíclica (ADRPc) y de los receptores CRF en la relajación producida por dicho péptido en las arterias renales de animales normoglucémicos.

Con respecto a los posibles mecanismos implicados en los efectos de la diabetes sobre la respuesta vascular a la urocortina, nuestro

análisis se centró en el estudio del papel del óxido nítrico, de los prostanoïdes y de los canales de potasio en la relajación producida por dicho péptido en arterias renales de ratas hembras diabéticas.

El estado funcional del endotelio se comprobó registrando la respuesta arterial a la acetilcolina (10^{-5} M) después de realizada la curva dosis-respuesta con urocortina en aquellos segmentos precontractados con endotelina-1.

Para estudiar el papel del óxido nítrico, prostanoïdes, canales de potasio, AMPc, protein kinasa A, calcio intracelular, adenosina difosfato ribosa cíclica, y receptores CRF en la relajación producida por la urocortina, se realizaron las curvas concentración-respuesta para este péptido en segmentos de arterias renales precontractados con endotelina-1, no tratados y tratados, respectivamente, además con una de las siguientes sustancias:

- Inhibidor de la síntesis de óxido nítrico: L-NAME (10^{-4} M, 3×10^{-4} M y 10^{-5} M).
- Inhibidor del enzima ciclooxigenasa: meclofenamato (10^{-5} M y 3×10^{-5} M).
- Inhibidor de los canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio: caribdotoxina (10^{-7} M, 3×10^{-7} M y 10^{-8} M).
- Inhibidor de la adenilato ciclasa: SQ22536 (3×10^{-4} M).
- Bloqueante de la adenosina difosfato ribosa cíclica: 8-br-cADRP (3×10^{-5} M).

- Inhibidor de la protein kinasa A: H89 (10^{-6} M).
- Regulador de los niveles de calcio intracelular por vaciamiento del retículo sarcoplásmico: rianodina (10^{-6} M).
- Antagonista inespecífico de los receptores CRF: astresina (10^{-6} M).
- Antagonista específico del receptor CRF subtipo CRF-R₂: α -helical (9-41) (10^{-6} M y 10^{-7} M).

Estas sustancias se añadían al baño de órganos 20 minutos antes de contraer las arterias con endotelina-1, y la curva concentración-respuesta con urocortina se obtenía en presencia de endotelina-1 y cada uno de los inhibidores citados. De forma paralela, también se obtenían curvas dosis-respuesta con urocortina en arterias precontraídas con endotelina-1 sin ningún otro tratamiento, y estas arterias eran consideradas como control.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La respuesta contráctil a la urocortina en las arterias con tensión pasiva fue nula, por lo tanto no es necesario indicar como se expresa.

La respuesta vasodilatadora a la urocortina en las arterias con tono activo extrínseco se expresa como porcentaje del tono activo inducido por la endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), y se calculó la media aritmética y el error estándar de la media. Estos valores nos permitieron obtener curvas concentración-respuesta medias para cada una de las situaciones experimentales. Por otra parte, para cada curva de

concentración-respuesta, se calculó la concentración eficaz 50 (EC_{50}), es decir, aquella concentración a la que la urocortina produce el 50% del efecto máximo. Para ello, se halla la mitad del efecto máximo y las concentraciones que lo acotan, y a continuación se calcula la concentración que corresponde a la mitad del efecto máximo mediante una proporción entre el efecto y el logaritmo de la concentración. Estos valores de la EC_{50} se expresan como pD_2 ($-\log EC_{50}$), ya que dichos valores se ajustan a una distribución normal.

El análisis estadístico para determinar posibles diferencias entre la respuesta obtenida en los machos y las hembras, no diabéticos y diabéticos, se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. Los valores obtenidos en ausencia y en presencia de bloqueantes fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test Dunnett, para analizar qué comparaciones eran estadísticamente significativas. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

7. SUSTANCIAS UTILIZADAS

Las soluciones de cada fármaco se preparaban inmediatamente antes de cada experimento en suero salino fisiológico con 0,01% de ácido ascórbico para evitar la oxidación del fármaco. En ningún caso el volumen total añadido al baño de órganos fue superior al 10% del volumen inicial del mismo. Las concentraciones se expresan en moles por litro (M) y representan la concentración final en el baño.

Los productos usados en el presente trabajo y la procedencia de cada uno de ellos se enumeran a continuación:

♦ De los laboratorios SIGMA se obtuvieron los siguientes productos:

- N^G - nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).
- Ácido meclofenámico (Meclofenamato).
- Caribdotoxina.
- 8-bromo- adenosin difosfato ribosa cíclica (8-br-cADRP) .
- N-(2(-Bromocinamilamino)-etil)-5-isoquinolinesulfonamida hidroxiclorido (H89).
- Rianodol 3-(1H-pirrol-2-carboxilato) (Rianodina).
- Fragmento CRF 12-41 (Astresina).
- Fragmento CRF 9-41 (α - helical (9-41)).
- Clorhidrato de Acetilcolina (Acetilcolina).
- Urocortina de rata.
- N-(Metilnitrosocarbonil)- α -D-glucosamina (Estreptozotocina).

♦ De los laboratorios Península, Europa, Ltd se obtuvo Endotelina-1 (Humana-porcina).

♦ De los laboratorios Calbiochen se obtuvo 9-(Tetrahydro-2-furanil)-9H-purin-6-amina (SQ22536).

RESULTADOS

Seis semanas después del tratamiento con estreptozotocina, tanto las ratas machos como las ratas hembras mostraron aumento de la glucemia ($P<0,01$), y disminución del peso corporal ($P<0,01$) comparado con los animales no tratados con estreptozotocina y de la misma edad. El peso corporal fue mayor en las ratas macho que en las hembras, tanto en los animales no diabéticos como en los animales diabéticos ($P<0,01$), pero la glucemia era similar en machos y en hembras, tanto en los normoglucémicos como en los diabéticos (Tabla 1).

1.- Efectos de la urocortina en las arterias basilar, coronaria, caudal y renal de ratas hembras y machos

En ninguno de los lechos vasculares estudiados la urocortina produjo efecto en las arterias con tensión basal. Sin embargo, en esos mismos lechos vasculares en presencia de tono activo inducido por endotelina-1, tanto en las arterias de las ratas hembras como en las de las ratas machos, la urocortina produjo una relajación que fue dependiente de la dosis. Las Figuras 6, 7, 8 y 9 muestran ejemplos de los registros con los efectos de la urocortina en las distintas arterias. La Figura 10 muestra la relajación en las arterias basilar, coronaria, caudal y renal de las ratas hembras, y permite comparar los efectos en los cuatro tipos de arterias.

La relajación empezó a manifestarse en los cuatro tipos de arterias con dosis muy bajas de urocortina (10^{-12} M). Los valores de la pD_2 y del

TABLA 1

Valores del peso y de la glucemia en las ratas machos y hembras, en condiciones de normoglucemia y 6 semanas después de inducir la diabetes con una inyección de estreptozotocina:

	MACHOS		HEMBRAS	
	normoglucémicos	diabéticos	normoglucémicas	diabéticas
Peso (g)	354 ± 11	238 ± 14 †	252 ± 4 *	186 ± 11 †
Glucemia (mg/100ml)	83 ± 3	420 ± 22 †	94 ± 3	444 ± 22 †
Número de animales	28	6	29	16

Los valores son media ± S.E.M. * Significativamente diferente entre ratas machos y hembras ($P < 0,001$) y † significativamente diferente entre ratas normoglucémicas y diabéticas. ($P < 0,001$).

efecto máximo para los cuatro tipos de arterias aparecen en la Tabla 2. Según estos datos el orden de sensibilidad fue caudal > renal = basilar > coronaria, y en cuanto a la máxima relajación alcanzada, el orden fue caudal=renal=basilar>coronaria.

2.- Arteria basilar

En los segmentos de arteria basilar a tensión basal, la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) no produjo ningún efecto (5 segmentos) (Figura 6). Los segmentos de arteria basilar precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M) desarrollaron un tono activo que fue de $0,38 \pm 0,03$ g en el caso de las hembras normoglucémicas y de $0,5 \pm 0,03$ g en los machos normoglucémicos. En los animales diabéticos el tono desarrollado fue de $0,26 \pm 0,03$ g en las hembras y de $0,27 \pm 0,04$ g en los machos. Este tono activo no fue significativamente diferente entre los distintos grupos estudiados y se mantuvo estable durante el experimento. En estos segmentos con tono activo, la urocortina produjo una relajación que fue dependiente de la dosis, y el efecto máximo fue de $85 \pm 15\%$ del tono activo en las hembras normoglucémicas, $95 \pm 12\%$ en los machos normoglucémicos, $70 \pm 17\%$ en las hembras diabéticas y $91 \pm 16\%$ en los machos diabéticos. Esta relajación no fue significativamente diferente entre los machos y las hembras, ni entre los animales normoglucémicos y diabéticos (Figuras 11, 12, 13).

TABLA 2

Valores de pD_2 y efecto máximo obtenidos en las curvas dosis-respuesta con urocortina en las arterias basilar, coronaria, caudal y renal de ratas machos y hembras normoglucémicas.

	MACHOS		HEMBRAS	
	pD_2	E. max (%)	pD_2	E. max (%)
Art. Basilar	9.14 ± 0.15	95 ± 12	9.19 ± 0.19	85 ± 15
Art. Coronaria	9.50 ± 0.23	47 ± 10	8.75 ± 0.35	34 ± 9
Art. Caudal	9.7 ± 0.2	98 ± 2	9.6 ± 0.17	100 ± 3
Art. Renal	9.31 ± 0.25	90 ± 2	9.32 ± 0.26	96 ± 2

3.- Arteria coronaria descendente anterior

En los segmentos de arteria coronaria a tensión basal, la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) no produjo ningún efecto (5 segmentos) (Figura 7). Los segmentos de arteria coronaria precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M) desarrollaron un tono activo de $0,25 \pm 0,03$ g en el caso de las hembras normoglucémicas y de $0,27 \pm 0,05$ g en los machos normoglucémicos. En los animales diabéticos, el tono desarrollado con endotelina-1 fue de $0,26 \pm 0,04$ g en las hembras y de $0,16 \pm 0,02$ g en los machos. Este tono activo no fue significativamente diferente entre los distintos grupos estudiados, y se mantuvo estable durante el experimento. En estos segmentos con tono activo, la urocortina produjo una relajación dependiente de la dosis, y el efecto máximo fue de $34 \pm 9\%$ en las hembras normoglucémicas, $47 \pm 8\%$ en los machos normoglucémicos, $44 \pm 10\%$ en las hembras diabéticas y $71 \pm 15\%$ en los machos diabéticos. Esta relajación no fue significativamente diferente entre los machos y las hembras, ni entre los animales normoglucémicos y diabéticos (Figuras 14, 15, 16).

4.- Arteria caudal

En los segmentos de arteria caudal a tensión basal, la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) no produjo ningún efecto (5 segmentos) (Figura 8). Los segmentos de arteria caudal precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M) desarrollaron un tono activo de $0,82 \pm 0,1$ g en el caso de las hembras

normoglucémicas y de $0,71 \pm 0,1$ g en los machos normoglucémicos. En los animales diabéticos el tono desarrollado fue de $0,82 \pm 0,1$ g en las hembras y $0,73 \pm 0,1$ g en los machos. Este tono activo no fue significativamente diferente entre los distintos grupos estudiados y se mantuvo estable durante el experimento. En estos segmentos con tono activo, la urocortina produjo una relajación dependiente de la dosis, y el efecto máximo fue de $100 \pm 3\%$ en las hembras normoglucémicas, $98 \pm 2\%$ en los machos sanos, $96 \pm 3\%$ en las hembras diabéticas y $97 \pm 2\%$ en los machos diabéticos. Esta relajación no fue significativamente diferente entre los machos y las hembras, ni entre los animales normoglucémicos y diabéticos (Figuras 17, 18, 19).

5.- Arteria renal

En los segmentos de arteria renal a tensión basal, la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) no produjo ningún efecto (5 segmentos) (Figura 20). Los segmentos de arteria renal precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M) desarrollaron un tono activo de $0,84 \pm 0,06$ g en el caso de las hembras normoglucémicas y $0,91 \pm 0,08$ g en los machos normoglucémicos. En los animales diabéticos el tono desarrollado fue de $0,91 \pm 0,08$ g en las hembras y de $1,1 \pm 0,2$ g en los machos. Este tono activo no fue significativamente diferente entre los distintos grupos estudiados y se mantuvo estable durante los experimentos.

En los segmentos de arteria renal con tono activo, la urocortina produjo una relajación dependiente de la dosis en todos los grupos estudiados (machos y hembras, normoglucémicos y diabéticos). En los segmentos procedentes de los animales normoglucémicos, el efecto máximo producido por la urocortina fue de $96 \pm 2\%$ en las hembras, y de $90 \pm 2\%$ en los machos. Esta relajación no fue significativamente diferente entre machos y hembras (Figura 21). En los segmentos procedentes de ratas macho diabéticos, el efecto producido por la urocortina no fue significativamente diferente a la obtenida en segmentos de los animales macho normoglucémicos (Figura 22). En cambio, el efecto máximo inducido por la urocortina en los segmentos procedentes de ratas hembras diabéticas ($46 \pm 8\%$) fue menor ($P < 0,01$) que el obtenido en segmentos procedentes de las hembras normoglucémicas ($96 \pm 0,2\%$) (Figura 23).

6.- Influencia del sexo en los mecanismos de relajación producidos por la urocortina en arterias renales

Como la urocortina no produjo efecto en las arterias a tensión basal y sí produjo vasodilatación en las arterias con tono activo, sólo se estudiaron los mecanismos implicados en esta vasodilatación. Asimismo, como sólo las arterias renales mostraron diferencias en la respuesta a la urocortina entre las ratas hembras y machos diabéticas, la influencia del

sexo sobre los mecanismos de acción de este péptido se analizaron sólo en este tipo de arterias de machos y hembras normoglucémicos.

En nuestro trabajo se examinó el papel del óxido nítrico, de los prostanoïdes, de los canales de potasio, del AMPc, de la protein kinasa A, del calcio intracelular, de la adenosina difosfato ribosa cíclica y de los receptores CRF en la relajación producida por la urocortina en las arterias renales de animales normoglucémicos y diabéticos.

a) En las arterias renales de hembras normoglucémicas, el L-NAME a las dosis de 10^{-4} M y 3×10^{-4} M disminuyó significativamente ($P < 0,01$) la relajación producida por la urocortina, mientras que a la dosis de 10^{-5} M no modificó dicha relajación ($P > 0,01$) (Figura 24).

El tratamiento con L-NAME a las dosis de 10^{-4} M y 3×10^{-4} M (Figura 25) no modificó significativamente la relajación producida por la urocortina en las arterias renales de los machos normoglucémicos.

b) El bloqueo de los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia con caribdotoxina a las dosis de 10^{-7} M y 3×10^{-7} M redujo significativamente la relajación con urocortina en arterias renales tanto de hembras ($P < 0,01$) como de machos ($P < 0,05$) normoglucémicos, mientras que a la dosis de 10^{-8} M no modificó la respuesta ($P > 0,01$) en estos mismos grupos de animales (Figura 26 y 27).

c) El inhibidor de la ciclooxygenasa meclofenamato (10^{-5} M y 3×10^{-5} M) no modificó la relajación en las arterias renales tanto de hembras como de machos normoglucémicos ($P > 0,01$) (Figuras 28 y 29).

d) La astresina (10^{-6} M), antagonista inespecífico de los receptores CRF, y el α -helical (9-41) (10^{-6} M), antagonista selectivo del subtipo de receptor CRF-R₂, redujeron de forma significativa la relajación a la urocortina en las arterias renales tanto de hembras como de machos normoglucémicos ($P < 0,01$). Sin embargo, la dosis de 10^{-7} M de α -helical (9-41) no modificó la relajación en las arterias renales de hembras normoglucémicas ($P > 0,01$) (Figuras 30, 31, 32, y 33).

e) El inhibidor de la adenilato ciclasa SQ 22536 (3×10^{-4} M) redujo significativamente la relajación a la urocortina en las arterias renales de las hembras normoglucémicas, pero no modificó de forma significativa dicha relajación en las arterias renales de machos normoglucémicos (Figuras 34 y 35). El tono activo inducido por la endotelina fue menor en las arterias tratadas con SQ 22536 ($0,43 \pm 0,06$ g en machos, y $0,52 \pm 0,11$ g en hembras) que en las arterias control (no tratadas con SQ22536). Para evaluar si esta diferencia en el tono podía afectar a la relajación con urocortina, se usó un grupo de segmentos controles precontraídos con una dosis menor de endotelina-1 (3×10^{-10} M); en este caso las arterias desarrollaron un tono ($0,50 \pm 0,03$ g en machos, y $0,61 \pm$

0,07 g en hembras) que fue similar en los segmentos no tratados (control) y tratados con SQ 22536. En estos segmentos con menor tono activo la relajación producida por la urocortina fue similar a la registrada en los segmentos controles con mayor tono activo.

f) El inhibidor de la protein kinasa A, H89 (10^{-6} M) redujo significativamente la relajación producida por la urocortina en las arterias renales de hembras normoglucémicas de ($P < 0,01$), e incrementó dicha relajación en las arterias de los machos normoglucémicos ($P < 0,05$) (Figuras 36 y 37).

g) El antagonista de adenosina difosfato ribosa cíclica, 8 Br-cADRP (3×10^{-5} M) produjo una reducción significativa de la relajación inducida por la urocortina en las arterias renales de hembras normoglucémicas ($P < 0,01$), mientras que no la modificó en las arterias renales de los machos normoglucémicos (Figuras 38 y 39).

h) Por último, la rianodina (10^{-6} M) redujo de forma significativa la relajación inducida por la urocortina en las arterias renales de hembras normoglucémicas ($P < 0,05$), e incrementó dicha relajación en las arterias renales de los machos normoglucémicos (Figuras 40 y 41).

7.- Efecto de la diabetes sobre la relajación producida por la urocortina en arterias renales

De los cuatro lechos vasculares estudiados, sólo las arterias renales de las hembras diabéticas presentaban alteración en la relajación a la urocortina. Por este motivo analizamos el papel de aquellos mecanismos que más frecuentemente se alteran en el transcurso de la diabetes y que podían aparecer alterados en las arterias renales de las ratas hembras diabéticas. Estos mecanismos están relacionados con la disfunción endotelial que a menudo ocurre en la diabetes, y entre ellos hemos estudiado el papel del óxido nítrico, de los prostanoideos y de los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia. Este estudio no se realizó en las arterias renales de los machos diabéticos porque en éstos no se alteró la relajación producida por la urocortina.

a) En las arterias renales de hembras diabéticas el antagonista de la sintasa del óxido nítrico L-NAME a las dosis de 10^{-4} M y 3×10^{-4} M no afectó significativamente a la relajación producida por la urocortina ($P > 0,01$) (Figura 42).

b) En las arterias renales de hembras diabéticas, el bloqueante específico de los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia caribdotoxina a las dosis de 10^{-7} M y 3×10^{-7} M no modificó significativamente la relajación producida por la urocortina ($P > 0,01$) (Figura 43).

c) En las arterias renales de las hembras diabéticas, el inhibidor de la ciclooxigenasa meclofenamato a la dosis de 10^{-5} M no modificó la relajación ($P>0,01$), pero la dosis de 3×10^{-5} M incrementó significativamente la relajación a la urocortina ($P<0,01$) (Figura 44).

Los efectos del L-NAME, caribdotoxina y meclofenamato sobre la relajación producida por la urocortina en las arterias renales de ratas hembras normoglucémicas se indican en las páginas 60 y 61 y en la Figuras 24, 26 y 28.

FIGURAS (6-44)

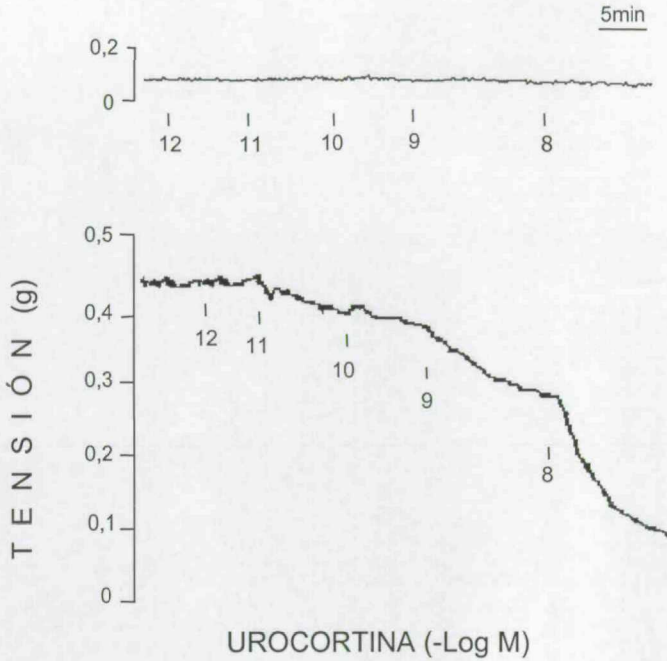


FIGURA 6. Registros de los efectos de la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en un segmento de arteria basilar de una rata hembra no diabética con tensión basal óptima (registro superior), y en otro segmento precontraído con endotelina-1 (5×10^{-9} M) (registro inferior).

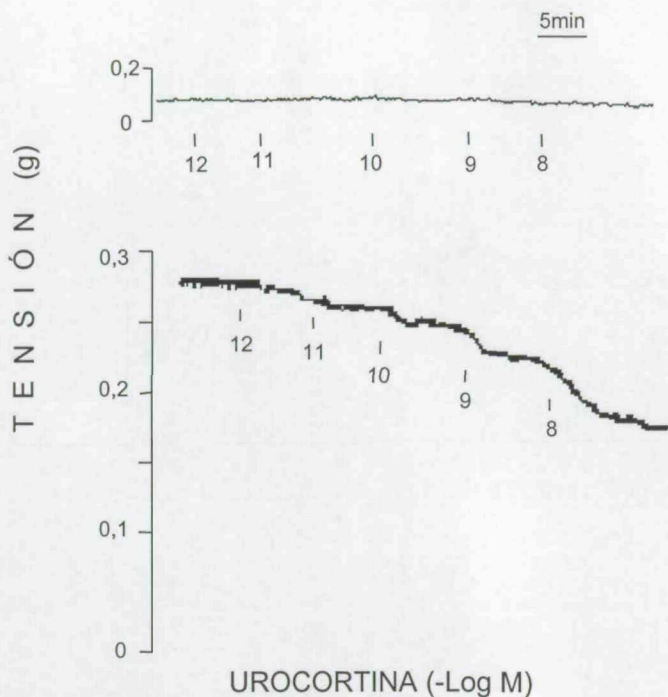


FIGURA 7. Registros de los efectos de la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en un segmento de arteria coronaria descendente anterior de una rata hembra no diabética con tensión basal óptima (registro superior), y en otro segmento precontraído con endotelina-1 (4×10^{-9} M) (registro inferior).

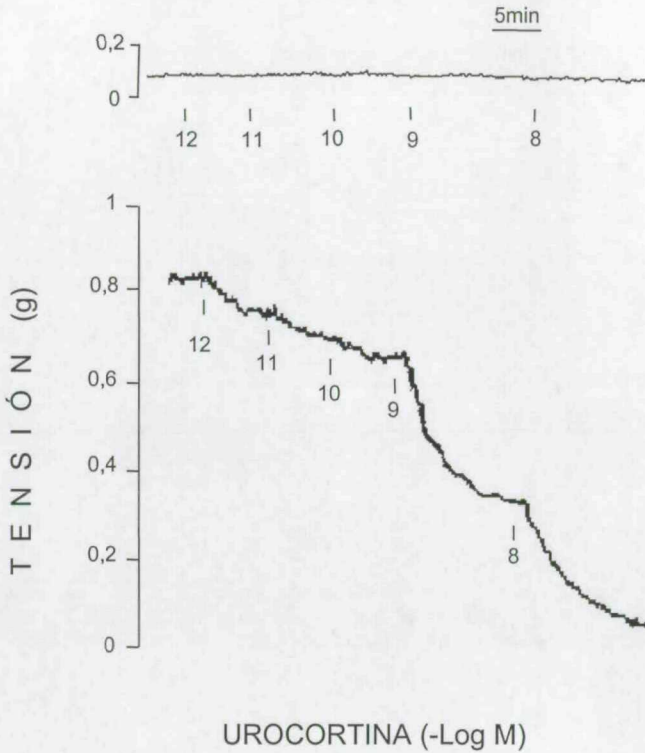


FIGURA 8. Registros de los efectos de la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en un segmento de arteria caudal de una rata hembra no diabética con tensión basal óptima (registro superior), y en otro segmento precontraído con endotelina-1 (7×10^{-9} M) (registro inferior).

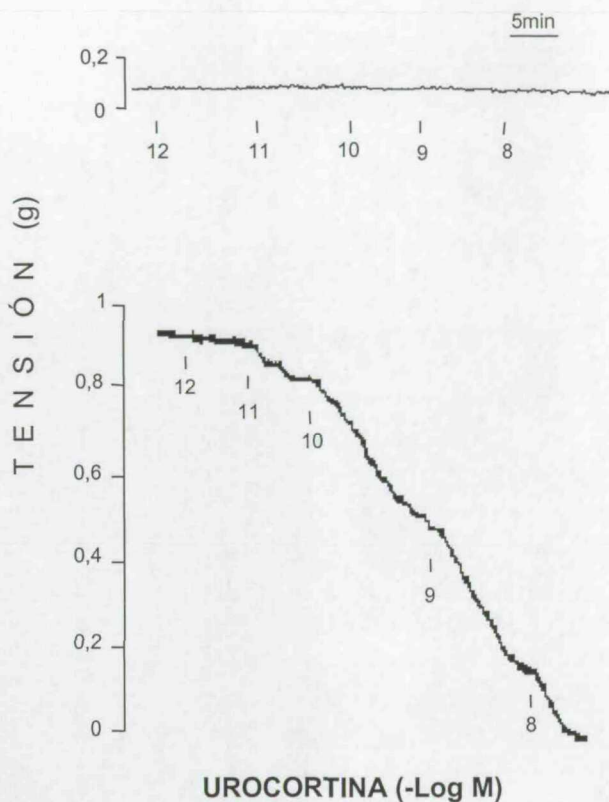


FIGURA 9. Registros de los efectos de la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en un segmento de arteria renal de una rata hembra no diabética con tensión basal óptima (registro superior), y en otro segmento precontraído con endotelina-1 (3×10^{-9} M) (registro inferior).

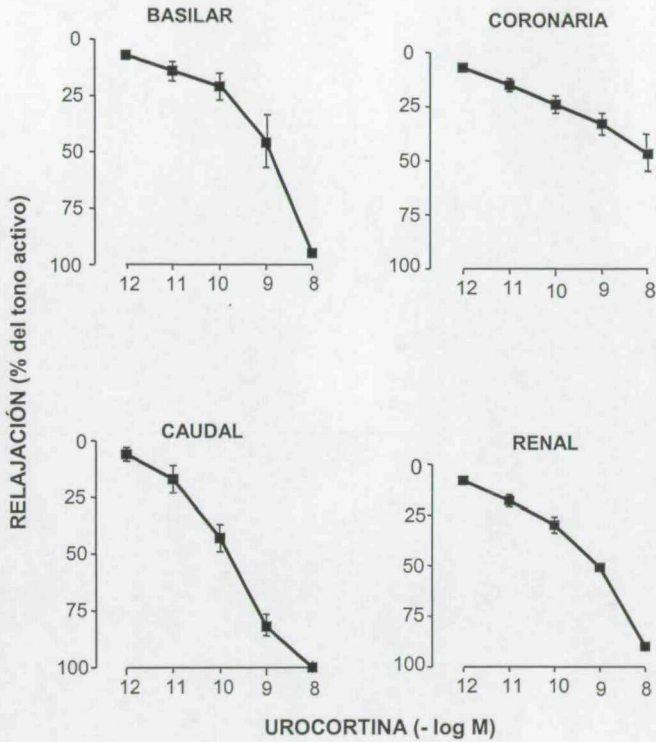


FIGURA 10. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en cuatro lechos vasculares de ratas hembras normoglucémicas.

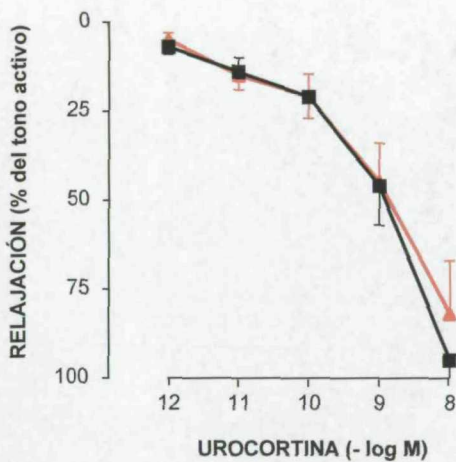


FIGURA 11. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria basilar precontraidos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas machos normoglucémicas (■, 5 segmentos de 5 individuos) y en ratas hembras normoglucémicas (▲, 6 segmentos de 6 individuos).

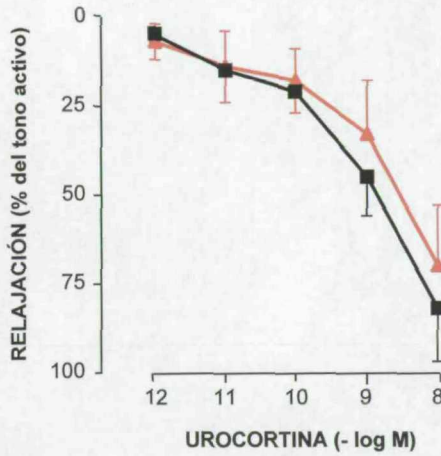


FIGURA 12. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria basilar precontraidos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas hembras normoglucémicas (■ , 6 segmentos de 6 individuos) y en ratas hembras diabéticas (▲ , 6 segmentos de 6 individuos).

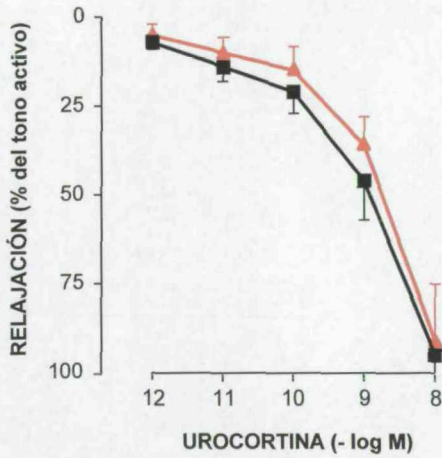


FIGURA 13. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria basilar precontraidos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas machos normoglucémicas (■, 5 segmentos de 5 individuos) y en ratas machos diabéticos (▲, 5 segmentos de 5 individuos).

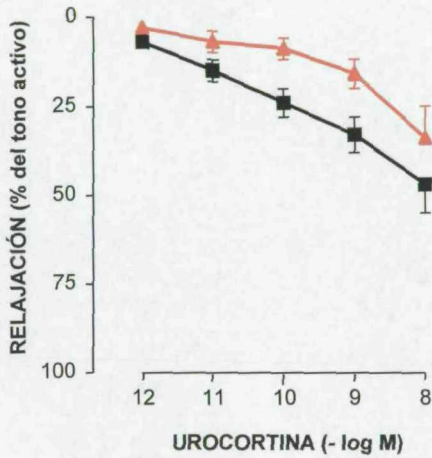


FIGURA 14. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria coronaria precontraidos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas machos normoglucémicos (■, 5 segmentos de 5 individuos) y en ratas hembras normoglucémicas (▲, 5 segmentos de 5 individuos).

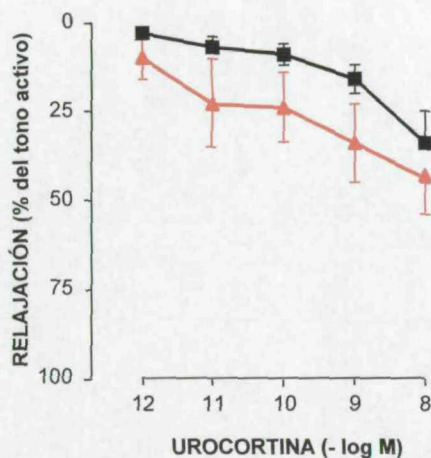


FIGURA 15. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria coronaria precontraidos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas hembras normoglucémicas (■, 6 segmentos de 6 individuos) y en ratas hembras diabéticas (▲, 7 segmentos de 7 individuos).

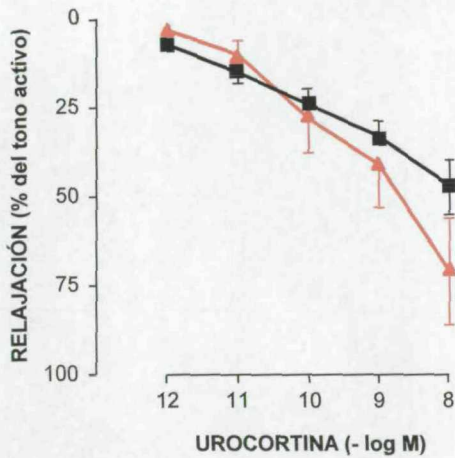


FIGURA 16. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria coronaria precontraidos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas machos normoglucémicos (■ , 5 segmentos de 5 individuos) y en ratas machos diabéticos (▲ , 5 segmentos de 5 individuos).

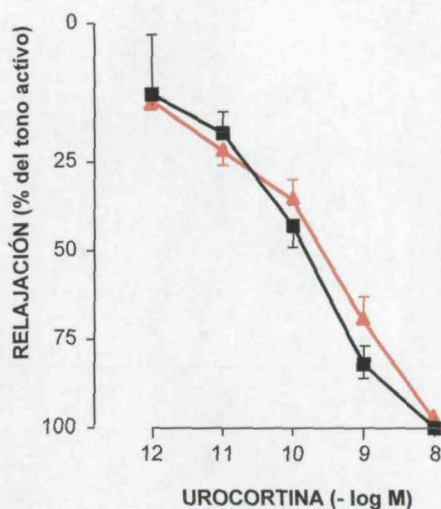


FIGURA 17. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria caudal precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas machos normoglucémicas (■, 13 segmentos de 13 individuos) y en ratas hembras normoglucémicas (▲, 11 segmentos de 11 individuos).

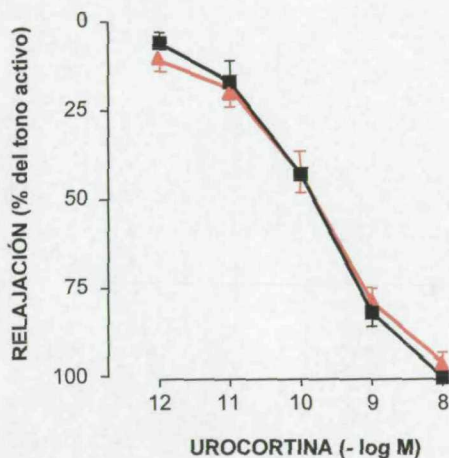


FIGURA 18. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria caudal precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas hembras normoglucémicas (■, 8 segmentos de 8 individuos) y en ratas hembras diabéticas (▲, 6 segmentos de 6 individuos).

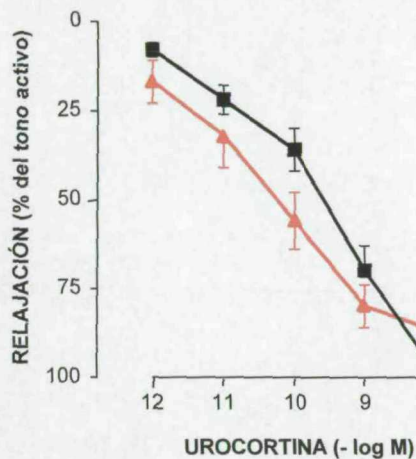


FIGURA 19. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria caudal precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas machos normoglucémicos (■, 8 segmentos de 8 individuos) y en ratas machos diabéticos (▲, 6 segmentos de 5 individuos).

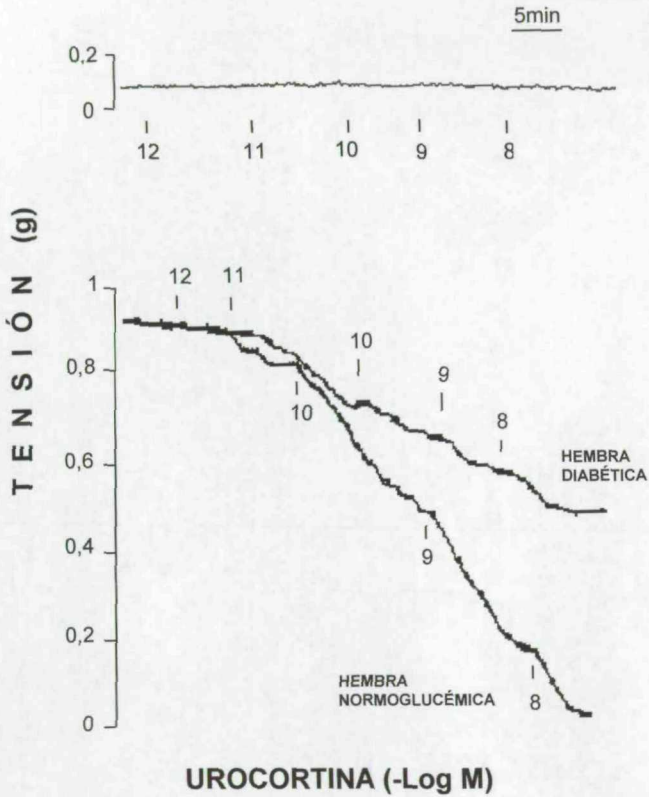


FIGURA 20. Registros de los efectos de la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en un segmento de arteria renal con tensión basal óptima (registro superior), y en segmentos precontraídos con endotelina-1 (5×10^{-9} M) de una hembra normoglucémica y de una hembra diabética (registro inferior).

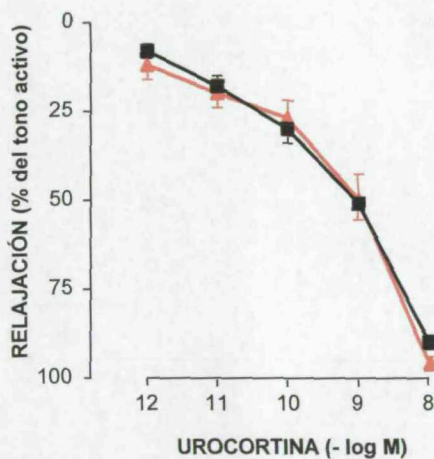


FIGURA 21. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas machos normoglucémicas (■, 28 segmentos de 28 individuos) y en ratas hembras normoglucémicas (▲, 29 segmentos de 29 individuos).

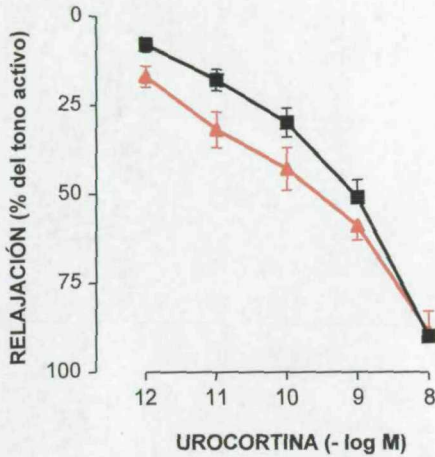


FIGURA 22. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas machos normoglucémicas (■, 28 segmentos de 28 individuos) y en ratas machos diabéticas (▲, 6 segmentos de 6 individuos).

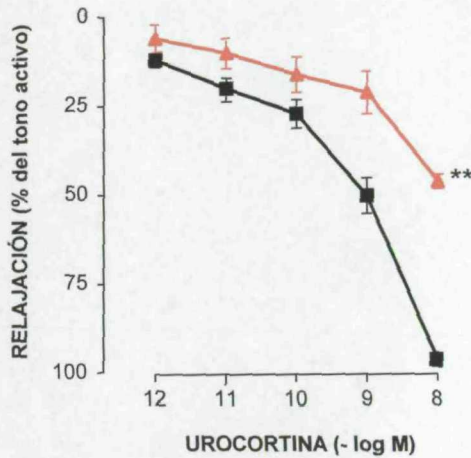


FIGURA 23. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal precontraidos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ratas hembras normoglucémicas (■, 29 segmentos de 29 individuos) y en ratas hembras diabéticas (▲, 16 segmentos de 16 individuos). **, estadísticamente significativo comparado con el control (** $P < 0,01$).

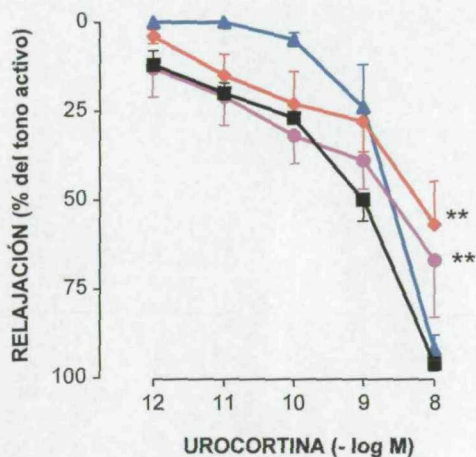


FIGURA 24. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de L-NAME 10^{-4} M (◆, 5 segmentos de 5 individuos), L-NAME 3×10^{-4} M (●, 5 segmentos de 5 individuos) y L-NAME 10^{-5} M (▲, 4 segmentos de 4 individuos). **, estadísticamente significativo comparado con el control (** $P < 0,01$).

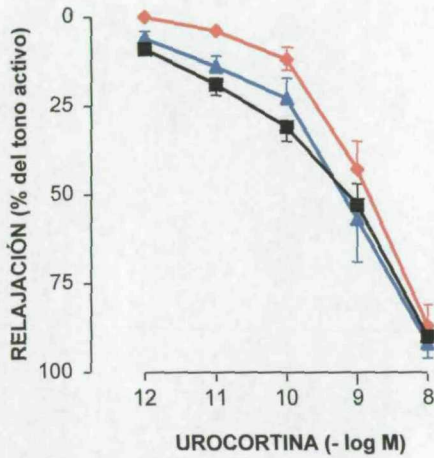


FIGURA 25. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicas precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de L-NAME 10^{-4} M (◆ , 6 segmentos de 6 individuos) y L-NAME 3×10^{-4} M (▲ , 7 segmentos de 7 individuos).

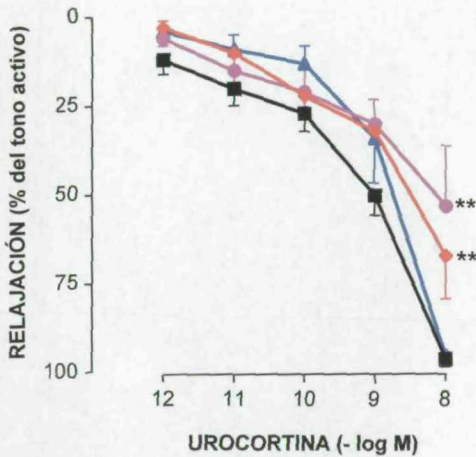


FIGURA 26. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de caribdoxina 10^{-7} M (◆ , 6 segmentos de 6 individuos), caribdoxina 3×10^{-7} M (● , 5 segmentos de 5 individuos) y caribdoxina 10^{-8} M (▲ , 5 segmentos de 5 individuos). **, estadísticamente significativo comparado con el control (** $P < 0,01$).

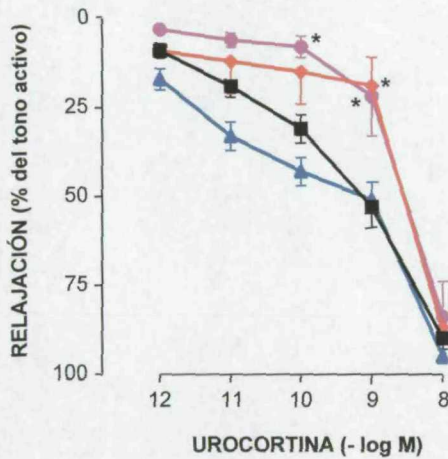


FIGURA 27. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicos precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de caribdotoxina 10^{-7} M (◆, 5 segmentos de 5 individuos), caribdotoxina 3×10^{-7} M (●, 5 segmentos de 5 individuos) y caribdotoxina 10^{-8} M (▲, 6 segmentos de 3 individuos). *, estadísticamente significativo comparado con el control (* $P < 0,05$).

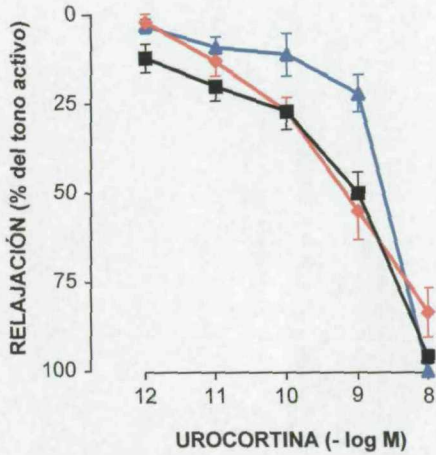


FIGURA 28. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de meclofenamato 10^{-5} M (◆ , 6 segmentos de 6 individuos) y meclofenamato 3×10^{-5} M (▲ , 5 segmentos de 5 individuos).

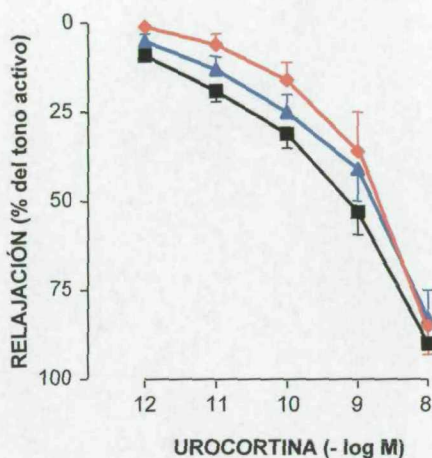


FIGURA 29. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicos precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de meclofenamato 10^{-5} M (◆ , 5 segmentos de 5 individuos) y meclofenamato 3×10^{-5} M (▲ , 6 segmentos de 6 individuos).

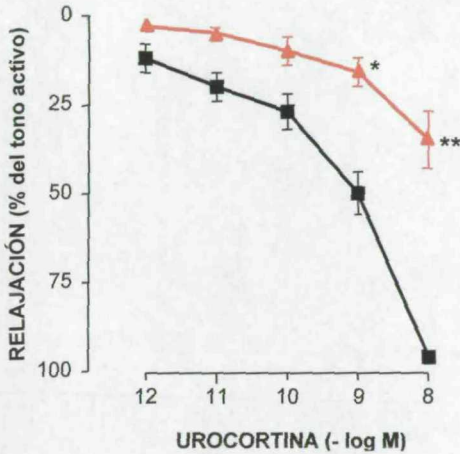


FIGURA 30. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de astresina 10^{-6} M (▲, 7 segmentos de 7 individuos). *, **, estadísticamente significativo comparado con el control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

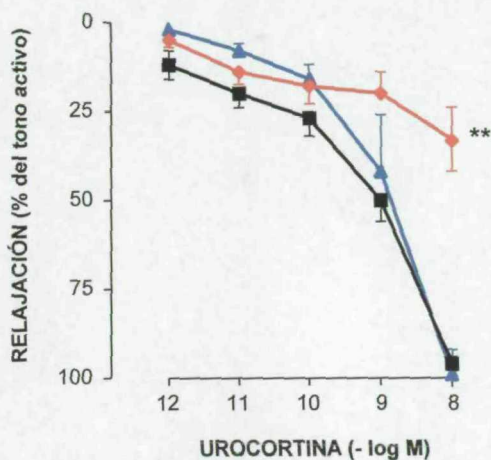


FIGURA 31. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de α -helical (9-41) 10^{-6} M (◆, 6 segmentos de 6 individuos) y α -helical (9-41) 10^{-7} M (▲, 4 segmentos de 4 individuos). **, estadísticamente significativo comparado con el control (** $P < 0,01$).

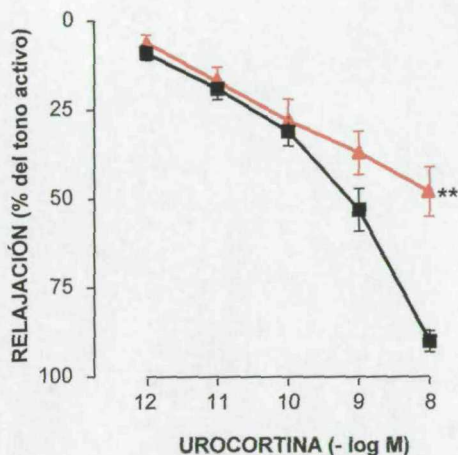


FIGURA 32. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicos precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-6} M), en ausencia (control) (■, 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de astresina 10^{-6} M (▲, 7 segmentos de 7 individuos). **, estadísticamente significativo comparado con el control (** $P < 0,01$).

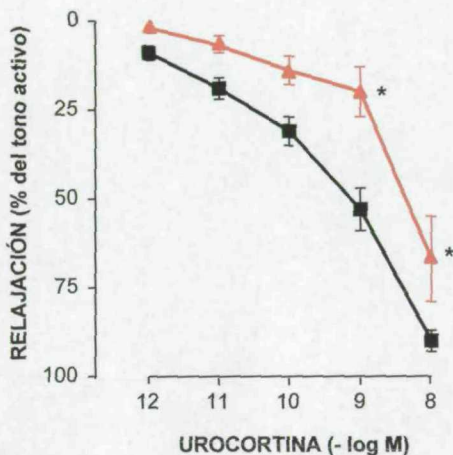


FIGURA 33. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicas precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de α -helical (9-41) 10^{-6} M (▲ , 6 segmentos de 6 individuos). *, estadísticamente significativo comparado con el control (* $P < 0,05$).

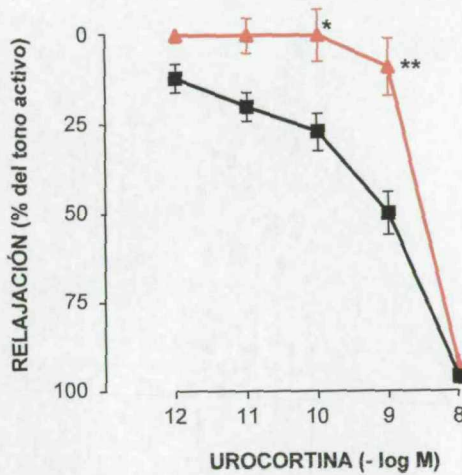


FIGURA 34. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de SQ22536 3×10^{-4} M (▲, 6 segmentos de 6 individuos). *, **, estadísticamente significativo comparado con el control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

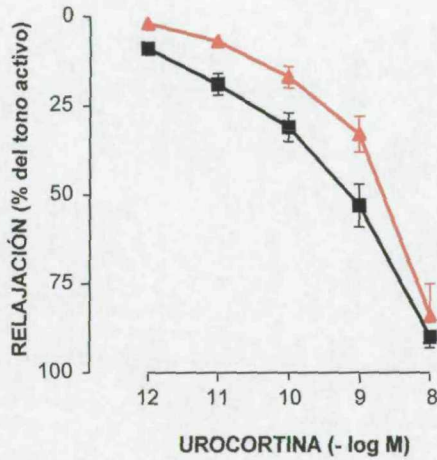


FIGURA 35. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicas precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de SQ22536 3×10^{-4} M (▲, 6 segmentos de 5 individuos).

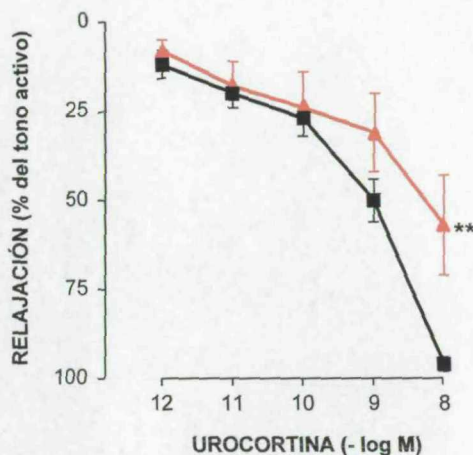


FIGURA 36. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de H89 10^{-6} M (▲, 7 segmentos de 7 individuos). **, estadísticamente significativo comparado con el control (** $P < 0,01$).

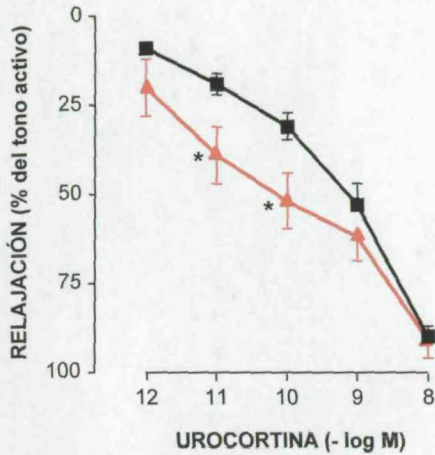


FIGURA 37. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicas precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de H89 10^{-6} M (▲ , 6 segmentos de 6 individuos). *, estadísticamente significativo comparado con el control (* $P<0,05$).

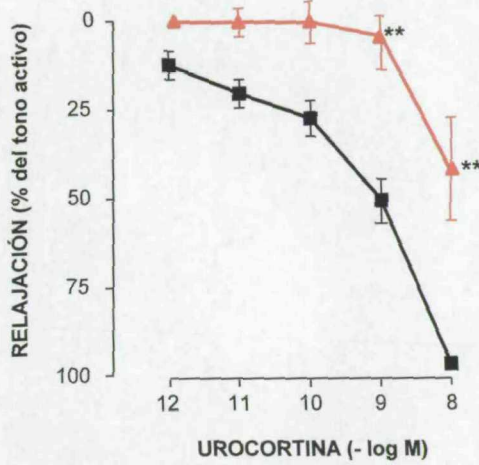


FIGURA 38. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de 8Br cADPR 3×10^{-5} M (▲ , 5 segmentos de 5 individuos). **, estadísticamente significativo comparado con el control (** $P < 0,01$).

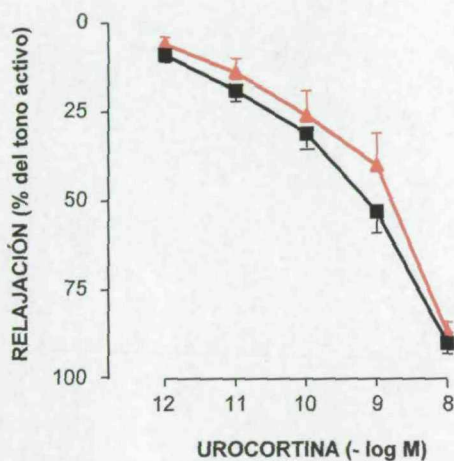


FIGURA 39. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicos precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de 8Br cADRP 3×10^{-5} M (▲, 6 segmentos de 6 individuos).

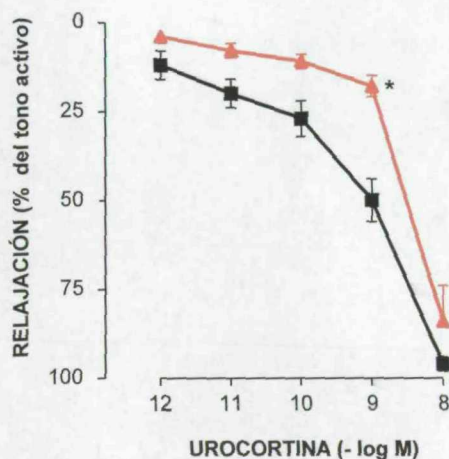


FIGURA 40. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras normoglucémicas precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 29 segmentos de 29 individuos) y en presencia de rianodina 10^{-6} M (▲, 7 segmentos de 7 individuos). *, estadísticamente significativo comparado con el control (* $P < 0,05$).

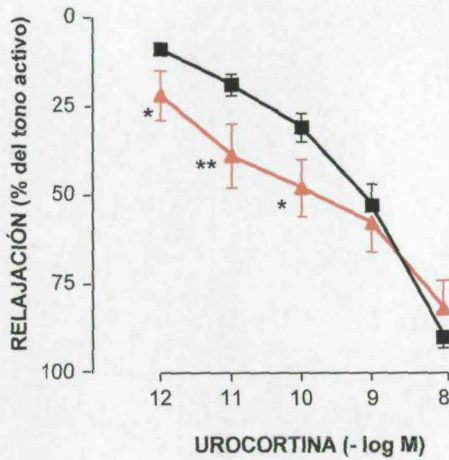


FIGURA 41. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas machos normoglucémicas precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 28 segmentos de 28 individuos) y en presencia de rianodina 10^{-6} M (▲, 8 segmentos de 7 individuos). *, **, estadísticamente significativo comparado con el control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

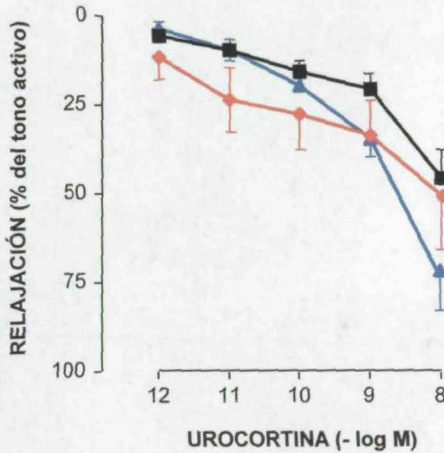


FIGURA 42. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras diabéticas precontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■, 16 segmentos de 16 individuos) y en presencia de L-NAME 10^{-4} M (◆, 6 segmentos de 6 individuos) y L-NAME 3×10^{-4} M (▲, 7 segmentos de 7 individuos).

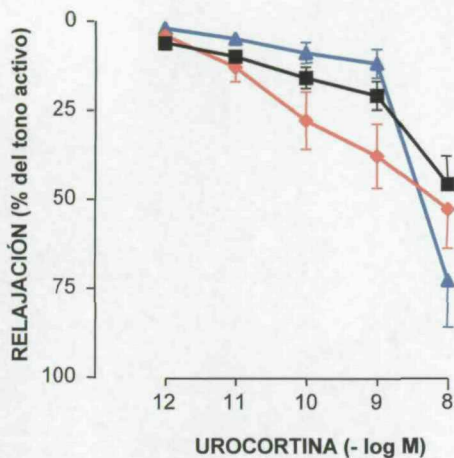


FIGURA 43. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembras diabéticas precontractados con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 16 segmentos de 16 individuos) y en presencia de caribdotoxina 10^{-7} M (◆ , 5 segmentos de 5 individuos) y caribdotoxina 3×10^{-7} M (▲, 7 segmentos de 7 individuos).

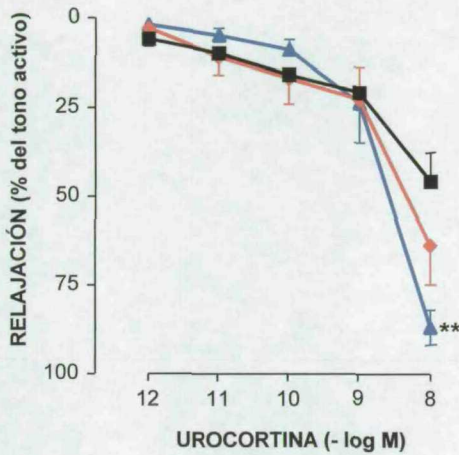


FIGURA 44. Resumen de la relajación producida por la urocortina (10^{-12} – 10^{-8} M) en segmentos de arteria renal de ratas hembra diabética sprecontraídos con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M), en ausencia (control) (■ , 16 segmentos de 16 individuos) y en presencia de meclofenamato 10^{-5} M (◆ , 6 segmentos de 6 individuos) y meclofenamato 3×10^{-5} M (▲ , 7 segmentos de 7 individuos). **, estadísticamente significativo comparado con el control (** $P < 0,01$).

DISCUSIÓN

1.- EFECTOS VASCULARES DE LA UROCORTINA

La urocortina, descubierta en 1995, es un péptido de 40 aminoácidos que se secreta en varios tejidos (cerebro, corazón, intestino, piel) y está presente en el plasma de los seres humanos. Este péptido está relacionado con el CRF y se ha asociado con diversas funciones, especialmente con la respuesta del organismo al estrés y con la regulación del sistema cardiovascular. Su probable papel en la regulación del sistema cardiovascular ha despertado gran interés entre los investigadores, pero los datos disponibles con respecto a sus efectos sobre el corazón y sobre los vasos sanguíneos son todavía escasos e incompletos. La mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo en ratas, utilizando preparaciones *in vivo* e *in vitro*, y en esta especie animal la urocortina produce vasodilatación (Terui *et al.*, 1999). En la oveja, en cambio, este péptido produce hipertensión arterial (Parkes *et al.*, 1997). Los estudios realizados en vasos sanguíneos humanos muestran que la urocortina produce vasodilatación, como ocurre en la rata (Leitch *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2002). Para saber si este péptido tiene o no un papel significativo en la regulación cardiovascular se requieren aún más estudios. En el presente trabajo hemos utilizado vasos sanguíneos de rata, ya que esta especie animal es fácil de conseguir y de manejar, es barata y es de uso común en el laboratorio para estudiar la función cardiovascular.

El primer objetivo de nuestro trabajo fue estudiar y comparar el efecto de la urocortina en diferentes lechos vasculares, y para ello se

eligieron arterias cerebrales (basilar), coronarias, cutáneas (caudal) y renales de rata. La elección de estos lechos vasculares es debido a que los vasos cerebrales, coronarios y renales son la diana más frecuente de la diabetes por lo que esta enfermedad se asocia a menudo con accidentes cerebrovasculares, cardiomiopatía isquémica y fallo renal. Las arterias cutáneas se eligieron para tener un testigo con el que comparar los resultados en los otros tres lechos vasculares estudiados.

En primer lugar, nuestros resultados indican que la urocortina no produce efectos en ninguno de los cuatro lechos vasculares estudiados cuando las arterias están con tono basal. Esto sugiere que este péptido no produce vasoconstricción cerebral, coronaria, renal ni cutánea. Todos los estudios realizados por otros investigadores utilizando vasos sanguíneos aislados indican que la urocortina produce vasodilatación, y ninguno indica que produce vasoconstricción. No obstante, la inyección de urocortina en el ventrículo lateral cerebral de ratas produce hipertensión (Spina *et al.*, 1996), y la inyección intravenosa en ovejas también produce hipertensión (Parkes *et al.*, 1997). No se sabe porqué en estos dos casos la urocortina produce hipertensión, tal vez ello está relacionado con sus efectos sobre el corazón y/o estructuras del sistema nervioso central relacionadas con la regulación del sistema cardiovascular.

En segundo lugar, nuestros resultados indican que este péptido produce un marcado efecto vasodilatador del lecho vascular cutáneo, coronario, cerebral y renal. Este efecto vasodilatador es dependiente de la

dosis y se inicia con concentraciones muy bajas (10^{-12}M) de este péptido. Estas concentraciones son comparables a los niveles plasmáticos medidos en humanos en condiciones normales (Watanabe *et al.*, 1999). Además, se ha descrito que la urocortina se produce en ciertos tejidos, como por ejemplo el corazón (Nishikimi *et al.*, 2000), y es probable que la concentración local tisular de este péptido sea mayor que en el plasma. Por tanto, teniendo en cuenta estos estudios, nuestros resultados sugieren que la urocortina podría desempeñar un papel relevante en la regulación de la circulación sistémica y en la regulación del flujo sanguíneo cerebral, coronario, cutáneo y renal. Por otro lado, hemos observado que la vasodilatación producida por la urocortina difiere entre los cuatro lechos vasculares estudiados ya que la sensibilidad y la magnitud de la respuesta de la arteria caudal y renal fueron mayores que las de la arteria basilar, y en esta arteria fueron aún mayores que en la arteria coronaria. Por tanto, la respuesta vascular a la urocortina difiere según el lecho vascular. Estudios realizados por otros investigadores indican que la inyección intravenosa de urocortina en la rata produce marcada hipotensión, la cual podría ser debida a una vasodilatación periférica (Vaughan *et al.*, 1995), y se ha propuesto que esta vasodilatación podría ocurrir principalmente en el lecho vascular mesentérico (Parkes & May, 2000). Según nuestros resultados, el efecto vasodilatador cerebral, coronario, cutáneo y renal también contribuiría a la hipotensión que produce la urocortina *in vivo*. En este sentido, el lecho

vascular cutáneo puede desempeñar un papel relevante porque cuando está dilatado recibe una fracción significativa del gasto cardiaco.

Las **arterias coronarias** fueron las que mostraron menor respuesta a la urocortina de los lechos vasculares estudiados en este trabajo. Trabajos previos indican que la urocortina tiene efectos protectores en el miocardio durante la isquemia coronaria (Brar *et al.*, 2000), y existen otras sustancias endógenas, además de la urocortina, con efecto cardioprotector frente al daño inducido por la hipoxia; entre estas sustancias están la cardiotropina-1 (Brar *et al.*, 2001), la protein kinasa Akt (Fujio *et al.*, 2000) y el interferon alfa/beta (Yang *et al.*, 2001). La producción de estas sustancias podría ser un mecanismo de defensa del miocardio ante la lesión isquémica. Este aspecto podría tener importancia por el potencial uso terapéutico de la urocortina durante el infarto de miocardio (Latchman, 2001). Sin embargo, su efecto hipotensor y su capacidad para producir hipertrofia del miocardio por incremento de la síntesis proteica y por expresión de péptidos específicos como el péptido natriurético auricular (Nishikimi *et al.*, 2000) representan serios inconvenientes para su posible uso terapéutico. Los presentes resultados apoyan la idea de que la administración de urocortina en pacientes con isquemia coronaria podría tener efectos adversos sobre la perfusión coronaria, donde la vasodilatación directa podría ser pequeña mientras que el efecto vasodilatador sistémico y consiguiente hipotensión podría ser más marcado. Este efecto vasodilatador sistémico podría desviar flujo sanguíneo a otros territorios vasculares (esplácnico, cutáneo) acentuando

la isquemia del miocardio. Nuestros resultados en la arteria coronaria son comparables a los obtenidos por Huang *et al.*, (2002), quienes observaron que la urocortina también produce vasodilatación coronaria en la rata. Huang *et al.*, 2002 observaron una sensibilidad similar y un efecto máximo mayor que los observados en el presente estudio.

En la **arteria basilar** el efecto vasodilatador de la urocortina fue más marcado que en las arterias coronarias, similar a la de la arteria renal y menor que en la arteria caudal. Esto sugiere, por tanto, que la urocortina tiene un considerable efecto vasodilatador cerebral. Nuestros resultados en la arteria basilar son similares a los descritos por Schilling *et al.*, (1998) en la arteria basilar de rata, y ambos estudios indican que la relajación producida por la urocortina en este lecho vascular se inicia con un rango de concentraciones del péptido de 10^{-10} – 10^{-12} M. La urocortina está presente en muchas regiones del cerebro de la rata, como por ejemplo el núcleo de Edinger-Westphal, oliva superior lateral (Vaughan *et al.*, 1995), sustancia negra, área tegmental ventral, núcleos del rafe dorsal y medial (Kozicz *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998) y el hipotálamo (Oki *et al.*, 1998). En el cerebro humano aparece inmunorreactividad a la urocortina y a su RNAm en todas las regiones examinadas, con mayor concentración en las cortezas frontal y temporal y en el hipotálamo (Takahashi *et al.*, 1998). Por consiguiente, la urocortina puede liberarse en el cerebro y actuar como un regulador local del flujo sanguíneo cerebral. Puesto que la liberación de urocortina puede estar asociada a la respuesta al estrés,

cabe suponer que en esta situación aumentaría la producción de este péptido e incrementaría el flujo sanguíneo cerebral.

En la **arteria caudal (cutánea)** fue donde la urocortina produjo mayor relajación, indicando que en este lecho vascular produce una pronunciada vasodilatación. Nuestros resultados son similares a los observados por Lubomirov *et al*, (2001) en este lecho vascular, y ambos estudios muestran que este péptido produce una relajación dependiente de la dosis y que esta relajación se inicia con la dosis de 10^{-10} – 10^{-12} M. Además, teniendo en cuenta que el efecto máximo en este tipo de arterias fue aproximadamente el 100% y que el lecho cutáneo recibe un marcado porcentaje del gasto cardíaco, se podría sugerir que este péptido interviene en la regulación de la circulación sistémica. Como la circulación cutánea está asociada con la regulación de la temperatura corporal, el efecto vasodilatador de la urocortina en este lecho facilitaría la eliminación del exceso de calor que se suele producir en las situaciones de estrés, situación en la que aumenta la producción de urocortina.

En lo que se refiere a **la arteria renal**, la urocortina también produce una marcada relajación con un efecto máximo que fue mayor que en la arteria coronaria, fue similar al observado en la arteria basilar y fue menor que el observado en la arteria caudal. Por tanto, la urocortina produce una notable vasodilatación renal. Los riñones son imprescindibles para regular la composición y el volumen del líquido extracelular, manteniendo estable el medio interno. Teniendo en cuenta que en las personas adultas los riñones reciben 1.2 – 1.3 litros de sangre por minuto,

lo que supone el 20-25% del gasto cardiaco, nuestros resultados sugieren que la urocortina podría tener un papel relevante en la regulación de la circulación renal y como consecuencia en la regulación de la circulación sistémica. Aunque existen diversos estudios dirigidos a examinar el efecto de distintas sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras sobre el lecho vascular renal (Moreno *et al*, 2003; Vargas *et al*, 1996; Yousif *et al*, 2002; Vargas *et al*, 1994), hasta donde nosotros sabemos no existen trabajos donde se analicen los efectos de la urocortina sobre este lecho vascular. Por tanto, nuestros resultados en la arteria renal constituyen una aportación novedosa con respecto al conocimiento de los efectos vasculares de la urocortina.

En resumen, la urocortina produce vasodilatación en los lechos vasculares estudiados (cerebral, coronario, cutáneo y renal) y como la urocortina está presente en el plasma y se produce en ciertos tejidos (miocardio, piel, intestino, cerebro) es probable que este péptido intervenga en la regulación de la circulación sistémica y local. Por tanto, la urocortina es un péptido endógeno que debe ser tenido en cuenta en la regulación del sistema cardiovascular.

2.- INFLUENCIA DEL SEXO EN LOS EFECTOS VASCULARES DE LA UROCORTINA

Otro objetivo del presente estudio fue analizar si el sexo influye o no en los efectos vasculares de la urocortina. Nuestros resultados indican que el efecto vasodilatador (sensibilidad y efecto máximo) de este péptido

fue similar en la arteria basilar, coronaria, caudal y renal de ratas machos y de ratas hembras normoglucémicos, sugiriendo que el sexo no influye en la magnitud de la respuesta vasodilatadora a la urocortina en condiciones normales. Esto no descarta que el sexo influya en los mecanismos que intervienen en esta vasodilatación.

La influencia del sexo en los mecanismos implicados en la vasodilatación producida por la urocortina se estudió sólo en la arteria renal porque la diabetes no afectó la respuesta a la urocortina en la arteria basilar, coronaria y caudal, pero sí la afectó en la arteria renal de hembras y no de machos. A continuación comentamos los mecanismos examinados en nuestro trabajo.

En primer hay que señalar que la relajación inducida por la urocortina en la arteria renal estaría mediada por la activación de receptores CRF del subtipo CRF-R₂ tanto en machos como en hembras normoglucémicos. Esta sugerencia se basa en que esta relajación se bloqueaba en las arterias renales de ambos sexos con astresina, antagonista de los subtipos receptoriales CRF-R₁ y CRF-R₂ (Gulyas *et al.*, 1995), y con α -helical (9-41), antagonista más específico del subtipo CRF-R₂ (Kishimoto *et al.*, 1985). Estos resultados confirman lo descrito en otros estudios donde se afirma que la urocortina produce sus efectos vasculares a través de la activación del subtipo de receptor CRF-R₂ (Parkes *et al.*, 2001). En ratas, el subtipo CRF-R_{2 α} está localizado principalmente en el tejido cerebral (Chalmers *et al.*, 1995) mientras que el subtipo CRF-R_{2 β} es predominante en otros tejidos, como por ejemplo

en el corazón (Perrin *et al.*, 1995), tracto gastrointestinal, músculo esquelético, epidídimo, arteriolas cerebrales, pulmón, ovarios y plexo coroideo (Lovenberg *et al.*, 1995; Perrin *et al.*, 1995; Kishimoto *et al.*, 1995; Stenzel *et al.*, 1995; Nozu *et al.*, 1999; Palchaudhuri *et al.*, 1999).

Los prostanoides probablemente no participan en la relajación de las arterias renales producida por la urocortina en ambos sexos, ya que dicha relajación no se modificó con el meclofenamato ni en machos ni en hembras normoglucémicos. Los resultados disponibles con respecto a la participación de los prostanoides en la vasodilatación a la urocortina son discrepantes ya que existen estudios indicando que en la arteria coronaria descendente anterior de rata aislada la relajación no se modificaba con indometacina (Huang *et al.*, 2002), mientras que en la circulación coronaria del corazón de rata aislado la relajación *in vitro* a la urocortina se reduce tras la inhibición de la ciclooxigenasa, sugiriendo por tanto que la vasodilatación de este lecho vascular está mediada por la liberación de prostaglandinas vasodilatadoras (Terui *et al.*, 2001). Utilizando otros lechos vasculares como por ejemplo la vena safena humana se ha observado que la relajación a la urocortina se potencia en presencia de meclofenamato sugiriendo que esta relajación está modulada por prostanoides vasoconstrictores (Sanz *et al.*, 2002). Por tanto, de estos estudios cabe deducir que la urocortina puede inducir la liberación de prostanoides dilatadores (en arterias) o constrictores (en venas) dependiendo del tipo de vaso sanguíneo, y quizá también del territorio vascular o la especie animal.

Con respecto al papel de los canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio, hemos observado que en las arterias renales procedentes de ratas machos y hembras normoglucémicas la relajación producida por la urocortina podría estar mediada por la activación de este tipo de canales. Esta sugerencia se basa en que dicha relajación se inhibía con caribdotoxina. Estos resultados concuerdan con los observados en la arteria basilar de rata (Schilling *et al.*, 1998) y en la vena safena humana (Sanz *et al.*, 2002), en los que también se sugiere que los canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio participan en la relajación inducida con urocortina. Sin embargo, datos obtenidos en la arteria coronaria de rata sugieren que son otro tipo de canales de potasio los que están implicados en la relajación producida por este péptido (Huang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003), sugiriendo que podrían existir diferencias regionales con respecto al tipo de canales de potasio implicados en la vasodilatación inducida por la urocortina. Además, nuestros resultados también sugieren que el antagonismo producido por la caribdotoxina en la relajación a la urocortina en las arterias renales puede ser diferente en función del sexo ya que en las ratas machos la caribdotoxina reduce la sensibilidad; mientras que en las hembras se reduce el efecto máximo. Por tanto, en las arterias renales de rata podrían existir diferencias en relación con el sexo en la participación de los canales de potasio en función de la concentración de urocortina. En resumen, la mayoría de los estudios concuerdan en que los canales de potasio, de uno u otro tipo, están

implicados en la vasodilatación producida por la urocortina, por lo que es posible que este sea uno de los principales mecanismos de acción de este péptido.

Se acepta en general que el óxido nítrico desempeña un papel clave en la respuesta vascular, y los datos disponibles sugieren que el sexo puede influir en la respuesta vascular debido principalmente a las diferencias que existen en la capacidad del endotelio vascular para liberar óxido nítrico. Parece ser que esta capacidad es mayor en los vasos sanguíneos de las hembras debido a la acción de las hormonas sexuales femeninas (Maddox *et al.*, 1987; Stallone *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1992; Kauser & Rubanyi, 1994; Hayashi *et al.*, 1992; Gisclard *et al.*, 1988; Kauser & Rubanyi, 1995). Varios estudios han mostrado que la vasodilatación mediada por el óxido nítrico suele ser mayor en arterias de hembras que en arterias de machos (ver Kauser & Rubanyi, 1997). Sin embargo, en el caso de la vasodilatación independiente del óxido nítrico no parece influir el sexo, puesto que la relajación de las arterias mesentéricas de rata con isoproterenol (Kähönen *et al.*, 1998), de las arterias coronarias de rata con el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Sheykhzade & Nyborg, 1998), de las arterias coronarias porcinas con prostaciclina (Barber & Miller, 1999), y de la arteria mamaria interna humana con nitroprusiato sódico (Dignan *et al.*, 1992) fue similar en machos y en hembras. En lo que se refiere a la urocortina, se ha demostrado que la relajación producida por este péptido es independiente del óxido nítrico en la vena safena humana (Sanz *et al.*, 2002) y de las

arterias basilar (Schilling *et al.*, 1998) y caudal (Lubomirov *et al.*, 2001) de rata. Existen varios estudios en los que se demuestra la posible influencia de las hormonas sexuales en la síntesis de óxido nítrico endotelial, y la existencia de diferencias en el papel del endotelio en la modulación del tono vascular en función del sexo (Maddox *et al.*, 1987; Stallone *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1992; Kauser & Rubanyi, 1994). Estos estudios sugieren que la producción de óxido nítrico es mayor en las hembras que en los machos, lo cual se ha asociado con las hormonas sexuales femeninas, principalmente el estradiol-17 β (Hayashi *et al.*, 1992; Gisclard *et al.*, 1988; Kauser & Rubanyi, 1995).

El óxido nítrico parece participar en la relajación producida por la urocortina en las arterias renales de las ratas hembras normoglucémicas, ya que en este caso el L-NAME redujo esa relajación (Sanz *et al.*, 2003). Sin embargo, en las arterias renales de las ratas macho normoglucémicas el L-NAME no modificó la relajación a la urocortina, sugiriendo que en este caso el óxido nítrico no está involucrado en esa relajación. Esto nos indica que el papel del óxido nítrico en la vasodilatación renal producida por la urocortina difiere según el sexo. Aunque el L-NAME inhibió la relajación a la urocortina en las arterias renales de las hembras, esta inhibición fue parcial y la urocortina seguía produciendo una relajación apreciable en presencia del L-NAME. Esto sugiere que otros mecanismos, además de la producción de óxido nítrico, pueden estar implicados en la vasodilatación renal inducida por la urocortina en las hembras.

En el músculo liso arterial, el AMPc puede mediar relajación a través de diferentes mecanismos, por ejemplo a través de la fosforilación y consiguiente apertura de canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca2+}); la apertura de este tipo de canales produce hiperpolarización de la célula y en consecuencia vasodilatación (Knot *et al.*, 1998; Benham *et al.*, 1986; Jaggar *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 1998). También existen evidencias de que la activación de los canales K_{Ca2+} puede ocurrir a partir de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico desencadenada por la activación de los receptores de la rianodina (Jaggar *et al.*, 2000; Valdivia *et al.*, 1995). Otros estudios han identificado la adenosina difosfato ribosa cíclica como el regulador principal del funcionamiento de los receptores de la rianodina en diversas preparaciones, incluido el músculo liso vascular (Lee *et al.*, 1989; Lee, 1997; Galione *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993), y se ha demostrado la participación de la adenosina difosfato ribosa cíclica en la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico tanto del músculo cardíaco (Cui *et al.*, 1999; Higashida *et al.*, 2001) como del músculo liso arterial (Kuemmerle & Makhoulouf, 1995; Prakash *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2001; Dipp & Evans, 2001). No obstante, también se ha observado que la dilatación de arterias pulmonares de rata está mediada por la adenilato ciclasa y por la producción de adenosina difosfato ribosa cíclica (Boittin *et al.*, 2003). En las arterias renales de las ratas hembras, observamos que la relajación en respuesta a la urocortina dependía de la síntesis de AMPc y de la activación de la protein kinasa A, ya que dicha relajación se reducía con inhibidores de sus respectivas enzimas, SQ2256

y H89. La relajación de las arterias renales de ratas hembras también se inhibió con el 8Br-cADRP, que es un antagonista de la adenosina difosfato ribosa cíclica. Asimismo, la relajación en respuesta a la urocortina en las arterias renales de las ratas hembras normoglucémicas se produciría también mediante liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, ya que dicha relajación se inhibía con rianodina, sustancia que vacía los depósitos de calcio del retículo sarcoplásmico. Por tanto, nuestros resultados en conjunto sugieren que el mecanismo de la relajación producida por la urocortina en la arteria renal de la rata hembra normoglucémica sería el siguiente: la urocortina se une al receptor CRF- $R_{2\beta}$ y activa la adenilato ciclasa, y en consecuencia se produce incremento de AMPc que estimula la protein kinasa A; esta enzima activa la síntesis de adenosina difosfato ribosa cíclica, la cual estimula los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico, se libera Ca^{2+} que activa los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia y se produce hiperpolarización de la célula de músculo liso y vasodilatación (Figura 45). Un mecanismo similar se ha propuesto para la relajación provocada por la estimulación β -adrenérgica de las arterias pulmonares de rata (Boittin *et al.*, 2002).

En las arterias renales de las ratas machos normoglucémicas la relajación a la urocortina difiere de lo que ocurre en las ratas hembras normoglucémicas. En los machos, la respuesta a la urocortina no estaría

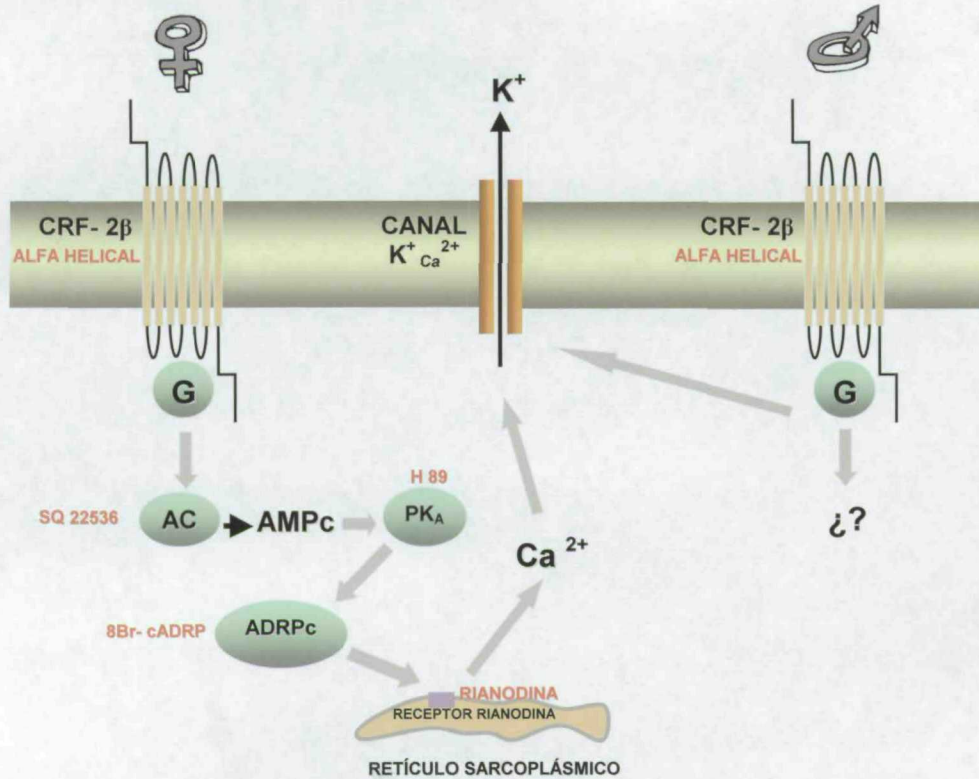


FIGURA 45. Resumen del mecanismo que se propone para explicar la acción de la urocortina en la arteria renal de ratas hembras (♀) y machos (♂) normoglucémicos (AC: adenilato ciclasa; PK_A: protein quinasa A; ADRPc: adenosina difosfato ribosa cíclica)

mediada por el AMPc, ni por la protein kinasa A ni por la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, ya que en este caso la relajación no se reducía con SQ22536, H89, 8 Br-cADPR ni rianodina. Nuestros resultados no llegan a esclarecer el mecanismo implicado en la vasodilatación renal producida por la urocortina en machos, pero como se ha indicado previamente los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia podrían estar involucrados en la relajación producida por la urocortina en la arteria renal tanto de machos como de hembras. Por tanto, este tipo de canales sería el estadio final y común en las arterias renales de ambos sexos para relajarse en respuesta a la urocortina, pero el camino para llegar a este estadio sería diferente en machos y hembras (Figura 45). A diferencia de las hembras, en los machos la activación de los receptores CRF-R₂ abriría dichos canales de forma independiente de AMPc, quizá a través de la proteína G que acopla el receptor de forma directa al canal de potasio (Figura 45) como parece ocurrir con los receptores beta adrenérgicos en el músculo liso de las arterias coronarias (Scornik *et al.*, 1993; Ahn *et al.*, 1995). Además, también se ha observado que en la arteria renal de los machos la rianodina curiosamente incrementó la relajación producida por la urocortina. Como la rianodina vacía los depósitos del calcio del retículo sarcoplásmico y el retículo sarcoplásmico parece ejercer un efecto amortiguador de los niveles de calcio citoplásmático, se puede sugerir que en las arterias renales de las ratas machos normoglucémicas la rianodina actuaría aboliendo dicho efecto amortiguador. En el músculo liso vascular, la

rianodina puede incrementar o disminuir la contracción producida por el potasio o la noradrenalina dependiendo del tipo de arteria (Asano & Nomura, 2000), probablemente porque disminuye la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico y al mismo tiempo elimina el efecto amortiguador de este retículo sobre las concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma. Basado en estos estudios, nuestros resultados sugieren que en las arterias renales de las hembras la rianodina disminuiría los niveles de Ca^{2+} del citoplasma, mientras que en las de los machos la rianodina aumentaría dichos niveles.

Mientras que la implicación de la protein kinasa A en la relajación de las arterias renales de las hembras parece estar clara, esta implicación en la relajación de las arterias renales de los machos es más confusa. En los machos la inhibición de la protein kinasa A con H89 incrementaba la relajación, y la inhibición del AMPc y de la adenosina difosfato ribosa cíclica no modificaba la relajación. Esto hace suponer que la apertura de los canales de potasio dependientes de calcio en la arteria renal de machos se produce por un mecanismo diferente que en las hembras (véase página 119, Figura 45). En el caso de los machos la protein kinasa A disminuiría la actividad de los canales de potasio dependientes de calcio por lo que actuaría contraponiéndose a la relajación. Se ha observado en el miometrio de rata que la protein kinasa A mediante la fosforilación directa de dichos canales produce activación o inactivación de dichos canales, en función del estado hormonal (gestante o no gestante) (Perez & Toro, 1994). La activación de los canales de potasio

dependientes de calcio en el caso de las ratas macho se produciría por un mecanismo independiente de protein kinasa A, de forma similar a como se ha descrito en el músculo liso de las vías respiratorias donde se ha observado que la activación de dichos canales se producía en parte por un mecanismo independiente de la protein kinasa A (Kume *et al.*, 1994).

Como se ha indicado con anterioridad, el un análisis de los mecanismos implicados en la relajación producida por la urocortina se llevó a cabo sólo en las arterias renales porque en este lecho fue donde encontramos diferencias en la afectación durante el transcurso de la diabetes en función del sexo. No debemos descartar, sin embargo, que en los restantes lechos vasculares también existan diferencias en el mecanismo de la relajación en respuesta a la urocortina en función del sexo. Nuestros datos obtenidos en la arteria renal nos ayudan a comprender porqué la incidencia de enfermedades cardiovasculares difiere de forma significativa entre hombres y mujeres. Aunque tradicionalmente se han asociado los estrógenos con un incremento en la producción de óxido nítrico, en las arterias renales de las ratas hemos observado que además de que la producción de óxido nítrico difiere entre ambos sexos, también aparecen diferencias en otros mecanismos de la vasodilatación en función del sexo.

3.- EFECTOS DE LA DIABETES EXPERIMENTAL EN LA ACCIÓN VASCULAR DE LA UROCORTINA

Las diferencias observadas entre sexos con respecto a los mecanismos de la relajación producida por la urocortina en la arteria renal puede relacionarse con diferencias en las alteraciones que se producen en dicho territorio vascular en el transcurso de procesos patológicos tales como la diabetes mellitus. Nuestro estudio muestra que la diabetes experimental no altera la respuesta a la urocortina en las arterias basilar, coronaria y caudal de ratas machos y hembras, pero sí alteró la respuesta en las arterias renales de las ratas hembras y no en las de los machos. Esta observación podría ser relevante para entender la fisiopatología de la vasculopatía diabética en general y de la nefropatía diabética en particular.

La diabetes puede afectar a la vasodilatación dependiente de endotelio ya que disminuye el papel del óxido nítrico en la vasodilatación sin afectar la vasodilatación independiente del endotelio (véase Pieper, 1998). Por tanto, la diabetes afectaría preferentemente la respuesta de aquellos vasos donde el óxido nítrico juega un papel más destacado. Dado que la relajación en respuesta a la urocortina en las arterias basilar (Schilling *et al.*, 1999) y caudal (Lubomirov *et al.*, 2001) es independiente de endotelio, cabe esperar que esta relajación no se afecte durante la diabetes, ni tampoco sea diferente entre machos y hembras. Esta suposición se confirma con nuestros resultados en dichos tipos de arterias ya que la diabetes no alteró los efectos de la urocortina en las arterias

basilar y caudal de machos y hembras. En el caso de la arteria coronaria, estudios previos han observado que la relajación a la urocortina depende en parte del endotelio (Huang *et al.*, 2002) y en parte es independiente del endotelio, teniendo lugar a través de la activación de canales de potasio (Huang *et al.*, 2003). Asimismo, se ha observado que la relajación dependiente de endotelio inducida con acetilcolina en la arteria coronaria de rata no se modifica durante el transcurso de la diabetes. En concordancia con estos estudios, nuestros resultados muestran que la diabetes no altera los efectos de la urocortina en los vasos coronarios de ratas hembras y machos.

La alteración de la relajación en respuesta a la urocortina observada en las arterias renales procedentes de las hembras diabéticas podría estar relacionada con una reducción en la liberación de óxido nítrico, ya que en este caso el L-NAME no modificó esta relajación. Esto contrasta claramente con el hecho de que este inhibidor de la síntesis de óxido nítrico sí que disminuía esa relajación en las arterias renales de hembras normoglucémicas. Estos resultados concuerdan con las observaciones que sugieren que la diabetes reduce la liberación de óxido nítrico en lechos vasculares tales como el mesentérico, coronario, renal... (véase de Vriese *et al.*, 2000, y Pieper, 1998). Se ha sugerido que la diabetes podría reducir la función del óxido nítrico en la vasodilatación actuando a tres niveles: 1) disminuyendo la síntesis del óxido nítrico en las células endoteliales (Chang & Stevens, 1992; Langenstroer & Pieper, 1992); 2) disminuyendo la biodisponibilidad del óxido nítrico una vez

liberado, como consecuencia de su inactivación por productos derivados de la glucosilación avanzada o por radicales libres (Pieper *et al.*, 1992), y 3) disminuyendo la sensibilidad del "receptor", es decir, de la guanilato ciclasa de la célula muscular lisa al óxido nítrico. Es importante señalar que la severidad de las alteraciones del endotelio puede ser diferente en función del lecho vascular estudiado, del sexo y de la duración de la diabetes (Pieper, 1998). Las modificaciones observadas en las arterias renales de las hembras en el transcurso de la diabetes están en concordancia con otros estudios en los que se señala que la alteración es más frecuente en las hembras que en los machos, tal como se deriva de los efectos de la acetilcolina en la arteria basilar (Mayhan *et al.*, 2002) y aorta (Pinna *et al.*, 2001) de rata, así como en la relajación producida por la metacolina en la circulación de la pierna de humanos (Steinberg *et al.*, 2000).

Otro mecanismo que podría explicar el efecto adverso de la diabetes sobre la relajación producida por la urocortina en las arterias renales de ratas hembras es la alteración de la activación de los canales de potasio durante esta enfermedad. Esta sugerencia se basa en que la caribdotoxina, bloqueante de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia, no modificó esa relajación en las arterias renales de ratas hembras diabéticas, contrariamente a lo encontrado en las arterias renales de las hembras normoglucémicas donde sí inhibió dicha relajación. Se ha descrito que la diabetes produce alteración en la relajación mediada por canales de potasio en la aorta (Glocker & Quast,

1997; Kamara *et al.*, 1989) y en las arterias caudal (Wang *et al.*, 2001), coronaria (Bouchard *et al.*, 1999) y carótida (Kamara *et al.*, 2000) de rata. Estudios previos han observado en las células de músculo liso de las arterias cerebrales de ratas diabéticas que los peroxinitritos (ONOO^-) procedentes de la reacción del anión superóxido con el óxido nítrico inhiben las propiedades de este tipo de canales (Brzezinska *et al.*, 2000). Por tanto, cabe sugerir que en las arterias renales de las ratas hembras diabéticas aumente la formación de radicales libres con disminución del óxido nítrico e incremento de los peroxinitritos, todo lo cual llevaría la alteración de la conductividad de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia, y ésto a su vez a la disminución observada en la relajación producida por la urocortina en estas arterias. Asimismo como es posible que parte del efecto relajador de la urocortina se produzca a través óxido nítrico con implicación de canales de K^+ , cabe proponer que sea la disminución del óxido nítrico lo que explique gran parte de la disminución del efecto de la urocortina en las arterias renales de las hembras diabéticas, sin que ello necesariamente requiera que estén alterados dicho tipo de canales de potasio. No obstante, no podemos descartar que el exceso de peroxinitritos puedan también alterar la conductividad de los mencionados canales de potasio.

Los prostanoides también podrían estar relacionados con la reducción producida por la diabetes en la relajación inducida por la urocortina en las arterias renales de ratas hembras. Nuestros estudios con meclofenamato indican que esta sustancia incrementa la respuesta

en dichas arterias durante la diabetes pero no durante la normoglucemia, sugiriendo que en esta situación patológica se incrementaría la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores. Existen estudios previos realizados en aorta de conejo donde se describe el incremento de prostanoïdes vasoconstrictores durante la diabetes (Tsfamariam *et al.*, 1991; Tsfamariam *et al.*, 1989). El incremento en la producción de prostanoïdes vasoconstrictores contribuiría a la disminución observada por nosotros en la vasodilatación producida por la urocortina en las arterias renales de hembras diabéticas. En este sentido se ha observado que en la aorta y en las arterias cerebrales y mesentéricas la relajación producida por sustancias distintas a la urocortina se normaliza en presencia de indometacina o del antagonista del receptor del tromboxano (Tsfamariam *et al.*, 1989; Mayhan *et al.*, 1991; Dai *et al.*, 1993; Shimizu *et al.*, 1993). Los estudios relacionados con el papel de los prostanoïdes son muy escasos, y nuestros resultados no nos permiten aventurar si el incremento de prostanoïdes vasoconstrictores está o no vinculado a la disminución del óxido nítrico y a la alteración de la conductividad de los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia.

Los resultados de nuestro trabajo contribuyen a consolidar la idea de que en el transcurso de la diabetes se altera la función vascular y que esta alteración difiere en función del sexo. Se ha descrito que en las mujeres diabéticas es mayor la incidencia de las enfermedades cardiovasculares que en los hombres diabéticos (Goldschmid *et al.*, 1994; Seeman *et al.*, 1993). En este sentido, la diabetes eliminaría la "ventaja"

que presentan las mujeres premenopáusicas con respecto a la incidencia de las enfermedades cardiovasculares. Existen varios trabajos experimentales dirigidos a examinar la influencia del sexo en la respuesta vascular durante la diabetes. Bolego *et al.* (1999) observaron que el tratamiento de ratas diabéticas con estrógenos mejoraba la vasodilatación dependiente de óxido nítrico. De forma similar, existen estudios realizados en vasos sanguíneos periféricos humanos (Lim *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 2000) y en arteria basilar de rata (Mayhan *et al.*, 2002) en los que se observa que la diabetes anula las diferencias sexuales en la vasodilatación dependiente de óxido nítrico. En el presente estudio se demuestra que en el caso de las arterias renales la relajación producida por la urocortina aparece disminuida de forma llamativa en las ratas hembras diabéticas, debido en parte a la disminución de la participación del óxido nítrico y en parte a la alteración en la activación de los canales de potasio y al incremento de los prostanoïdes vasoconstrictores. Sin embargo, en las arterias renales de machos la relajación a la urocortina no se modifica en el transcurso de la diabetes, debido quizá a que los mecanismos de acción de este péptido, especialmente el papel óxido nítrico, varía con el sexo de los individuos.

Para el conocimiento de la fisiopatología de las alteraciones vasculares inducida por la diabetes puede ser útil el uso de herramientas nuevas. Este podría ser el caso de la urocortina la cual es una sustancia de reciente descubrimiento que presenta marcados efectos vasculares y cuyos efectos parecen alterarse en la diabetes. El hecho de que sean las

arterias renales y no las cerebrales, coronarias y cutáneas donde hemos observado que la diabetes altera la relajación a la urocortina puede estar relacionado con la duración de la diabetes, y quizá el lecho vascular renal sea más sensible que los otros lechos vasculares a los efectos adversos de esta enfermedad. Nuestro estudio en los animales diabéticos se realizó después de 6 semanas de diabetes, y cabe suponer que manteniendo los animales con diabetes durante más tiempo se produzcan alteraciones también en los otros lechos vasculares, ya que son también diana de los efectos nocivos de esa enfermedad, al menos en la clínica humana.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La urocortina es un péptido relacionado con el factor de liberación de corticotropina (CRF) que puede intervenir en la regulación cardiovascular. El objetivo de nuestro estudio fue analizar los efectos vasculares de la urocortina así como la influencia del sexo y la repercusión de la diabetes mellitus en esos efectos. Para ello, se utilizaron arterias basilar, coronaria, caudal y renal de ratas machos y hembras, normoglucémicas y diabéticas. Las arterias se montaron en baños de órganos para el registro de la tensión isométrica, y la diabetes se indujo mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina.

Los **RESULTADOS** obtenidos fueron los siguientes:

1. En los cuatro tipos de arterias con tensión basal, la urocortina (10^{-12} - 10^{-8} M) no produjo ningún efecto, mientras que en los cuatro tipo de arterias con tono activo inducido con endotelina-1 (10^{-9} – 10^{-8} M) este péptido produjo relajación dependiente de la dosis.

2. La relajación producida por la urocortina fue similar en las arterias de ratas machos y hembras. Según los valores de la pD_2 el orden de sensibilidad fue el siguiente: caudal>renal=basilar>coronaria para ambos sexos, y según el efecto máximo el orden fue el siguiente: caudal=renal=basilar>coronaria también en ambos sexos.

3. Con respecto a los mecanismos implicados en la relajación producida por la urocortina en las arterias renales observamos lo siguiente: a) en ambos sexos, la relajación se bloqueó con los antagonistas de los receptores CRF (astresina y α -helical (9-41) y el bloqueante de los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia (caribdotoxina), y no se modificó con el inhibidor de la ciclooxigenasa (meclofenamato); b) en las ratas hembras, la relajación se redujo con el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME), con el inhibidor de adenilato ciclasa (SQ22536), con el inhibidor de la protein kinasa A (H89), con el regulador de los niveles de calcio (rianodina) y con el inhibidor de la adenosina difosfato ribosa cíclica (8Br-cADRP), y c) en los machos, la relajación no se modificó con el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME), ni con el inhibidor de la adenilato ciclasa (SQ22536) ni con el inhibidor de la adenosina difosfato ribosa cíclica (8Br-cADRP), mientras que se incrementó con el regulador de los niveles de calcio (rianodina) y con el inhibidor de la protein kinasa A (H89).

4. En las ratas diabéticas la relajación a la urocortina no estaba alterada en las arterias basilar, coronaria y caudal de machos y hembras, pero estaba disminuida en las arterias renales sólo de las ratas hembras. En las arterias renales de ratas hembras diabéticas la relajación producida por la urocortina no se modificó con el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME) ni con el bloqueante de los canales de potasio

dependientes de calcio de alta conductancia (caribdotoxina), mientras que se incrementó con el inhibidor de la ciclooxygenasa (meclofenamato).

Estos resultados nos permiten llegar a las siguientes

CONCLUSIONES:

1. La urocortina posee un marcado efecto vasodilatador cerebral, coronario, renal y cutáneo, cuya magnitud difiere según el lecho vascular, pero es similar en ambos sexos. Esto sugiere que este péptido puede intervenir en la regulación de la circulación sistémica y en la regulación del flujo sanguíneo cerebral, coronario, renal y cutáneo.

2. El sexo no parece influir en la magnitud de los efectos vasculares de la urocortina pero si podría influir en los mecanismos implicados en esos efectos, al menos en algunos lechos vasculares (p.e. el renal). En el lecho vascular renal de las hembras el efecto de la urocortina está mediado por la activación de los receptores CRF- $R_{2\beta}$, por el óxido nítrico y por el incremento de AMPc; este incremento del AMPc activaría la protein quinasa A y la producción de adenosina difosfato ribosa cíclica, lo cual induciría la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y en consecuencia la activación de los canales de potasio dependientes de calcio. En el caso de los machos, el efecto de la urocortina está mediado por la activación de los receptores CRF- $R_{2\beta}$, pero es independiente del óxido nítrico, del AMPc y de la liberación de Ca^{2+} del retículo

sarcoplásmico; la activación de los canales de potasio dependientes de calcio se haría a través de un mecanismo independiente del AMPc.

3. De los cuatro lechos vasculares estudiados, la diabetes experimental afectó a la vasodilatación producida por la urocortina sólo en las arterias renales de hembras pero no en las de los machos. En las ratas hembras diabéticas, la vasodilatación producida por la urocortina en las arterias renales está disminuida debido probablemente a que disminuye la liberación de óxido nítrico, se incrementa la de prostanoïdes vasoconstrictores y se alteran los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia, y

4. Por último, este estudio contribuye a conocer los efectos vasculares de la urocortina, así como la influencia del sexo y la repercusión de la diabetes en esos efectos. Este trabajo aporta especialmente dos aspectos novedosos respecto a la urocortina: 1) el efecto vasodilatador de este péptido en el lecho cerebral, coronario y cutáneo no depende del sexo ni se altera durante la diabetes, y 2) en el lecho vascular renal, la vasodilatación producida por la urocortina presenta diferentes mecanismos de acción en función del sexo, y se altera durante la diabetes en el caso de las hembras pero no en el caso de los machos.

BIBLIOGRAFÍA

ANG C, HILLIER C, CAMERON AD, GREER IA, LUMSDEN MA. The effect of type 1 diabetes mellitus on vascular responses to endothelin-1 in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Oct;86(10):4939-42.

ARAI M, ASSIL IQ, ABOU-SAMRA AB. Characterization of tree corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* 2001; 142: 446-454.

ASAKAWA A, INUI A, UENON, MAKINO S, FUJINO MA, KASUGA M. Urocortin reduces food intake and gastric emptying in lean and ob/ob obese mice. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1287-1292.

ASANO M, NOMURA Y. Ca^{2+} movement from leaky sarcoplasmic reticulum during contraction of rat arterial smooth muscles. *Eur J Pharmacol.* 2000 Sep 22; 404 (3):327-39.

AUCH-SCHWELK W, KATUSIC ZS, VANHOUTTE PM. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* 1990; 15(6 Pt. 2):699-703.

BAIGENT SM. Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 2001; 22: 809-820.

BAILEY CC. Alloxan diabetes. *Vit. Horm.* 1949; 7: 365-382.

BAMBERGER CM, WALD M, BAMBERGER AM ERGUN S, BEIL FU, SCHULTE HM. Human lymphocytes produce, but not corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:708-711.

BARBER DA, MILLER VM. Gender differences in endothelium-dependent relaxations do not involve NO in porcine coronary arteries. *Am J Physiol.* 1997 Nov; 73 (5 Pt 2):H2325-32.

BARRET- CONNOR E & BUSH TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 1991; 265: 1861-1867.

BARRET-CONNOR E. Is insulin-dependent diabetes mellitus caused by coxsackie virus B infection?. A review of the epidemiologic evidence. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7: 207-215.

BARRET-CONNOR E. Sex differences in coronary Herat disease: why are woman so superior?. The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 1997; 95: 252-264.

BELL RH JR, HYE RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res.* 1983; 35 (5): 433-60.

BENHAM CD, BOLTON TB. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J Physiol.* 1986 Dec; 381: 385-406.

BOITTIN FX, DIPP M, KINNEAR NP, GALIONE A, EVANS AM. Vasodilation by the Calcium-mobilizing Messenger Cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 2003 Mar 14; 278 (11):9602-8.

BOLEGO C, CIGNARELLA A, ZANCAN V, PINNA C, ZANARDO R, PUGLISI L. Diabetes abolishes the vascular protective effects of estrogens in female rats. *Life Sci.* 1999; 64: 741-749.

BOUCHARD JF, DUMONT EC, LAMONTAGNE D. Modification of vasodilator response in streptozotocin-induced diabetic rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999 Dec; 77 (12):980-5.

BRAR BK, JONASSEN AK, STEPHANOU A, SANTILLI G, RAILSON J, KNIGHT RA, YELLON DM, LATCHMAN DS. Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000;275:8508-8514.

BRAR BK, STEPHANOU A, KNIGHT RA, LATCHMAN DS. Activation of protein Kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(4): 483-492.

BRAR BK, STEPHANOU A, OKOSI A, LAWRENCE KM, KNIGHT RA, MARBER DS, LATCHMAN DS. CRF-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 158: 55-63.

BROWN MR, FISHER LA. Regulation of the autonomic nervous system by corticotropin-releasing factor in: De Souza EB, Nemeroff CB (Eds.), *Corticotropin-Releasing Factor: Basic and Clinical Studies of a Neuropeptide*. CRC Boca Raton 1990, pp 291-298.

BRZEZINSKA AK, GEBREMEDHIN D, CHILIAN WM, KALYANARAMAN B, ELLIOTT SJ. Peroxynitrite reversibly inhibits Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jun;278(6):H1883-90.

BUSH TL, BARRETT-CONNOR E, COWAN LD, CRIQUI MH, WALLACE RB, SUCHINDRAN CM, TYROLER HA, RIFKIND BM. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation*. 1987 Jun; 75(6):1102-9.

CHALMERS DT, LOVENBERG TW, DE SOUZA EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2)mRNA expression to specific subcortical nuclei brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 1995; 15: 6340-6350.

CHAN NN, VALLANCE P, COLHOUN HM. Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes. *Diabetologia* 2000;43 (2):137-47.

CHANG KS, STEVENS WC. Endothelium-dependent increase in vascular sensitivity to phenylephrine in long-term streptozotocin diabetic rat aorta. *Br J Pharmacol.* 1992 Dec; 107 (4):983-90.

CHEN R, LEWIS KA, PERRIN MH, VALE WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8967-8971.

COHEN M.L., BLOOMQUIST W., LI D., IYENGAR S. Effect of acute and subchronic subcutaneous urocortin on blood pressure and food consumption in *ob/ob* mice. *Gen. Pharmacol.*, 2000; 34: 371-377.

COHEN R & WEISBROD RM. Endothelium inhibits norepinephrine from adrenergic nerves of rabbit carotid artery. *Am. J. Physiol.* 1988; 254: H871-H878.

COSTE SC, KESTERSON RA, HELDWEIN KA, STEVENS LS, HEARD AD, HOLLIS JH, MURRAY SE, HILL JK, PANTELY GA, HOHIMER AR, HATTON DC, PHILLIPS TJ, FINN DA, LOW MJ, RITENBERG MB, STENZEL P, STENZEL-POORE MP. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet* 2000;24:403-409.

CRAIDHEAD JE. The role of viruses in the pathogenesis of pancreatic disease and diabetes mellitus. *Prog. Med. Virol.* 1975; 19: 161-214.

CREPALTI G & NOSADINI R. Diabetic cardiomyopathy: is it a real entity?.
Diabetes Metab. Rev. 1988; 4: 273-288.

CUI Y, GALIONE A, TERRAR DA. Effects of photoreleased cADP-ribose
on calcium transients and calcium sparks in myocytes isolated from
guinea-pig and rat ventricle. Biochem J. 1999 Sep 1; 342 (Pt 2):269-73.

DAI FX, DIEDERICH A, SKOPEC J, DIEDERICH D. Diabetes-induced
endothelial dysfunction in streptozotocin-treated rats: role of prostaglandin
endoperoxides and free radicals. J Am Soc Nephrol. 1993 Dec;4(6):1327-
36.

DAUTZENBERG FM, KILPATRICK GJ, HAUGER RL, MOREAU J.
Molecular biology of the CRH receptors-in the mood. Peptides 2001;
22(5)153-760.

DE VRIESE AS, VERBEUREN TJ, VAN DE VOORDE J, LAMEIRE NH,
VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction in diabetes. Br J Pharmacol.
2000 Jul;130(5):963-74.

DIETRICH KD, LEHNERT H, DE SOUZA EB. Corticotropin-releasing
factor receptors: an overview. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1997; 105:65-
82.

DIGNAN RJ, YEH T JR, DYKE CM, LUTZ HA 3RD, WECHSLER AS. The
influence of age and sex on human internal mammary artery size and
reactivity. Ann Thorac Surg. 1992 May;53(5):792-7.

DIPP M, EVANS AM. Cyclic ADP-ribose is the primary trigger for hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat lung in situ. *Circ Res*. 2001 Jul 6; 89 (1):77-83.

DONALDSON CJ, SUTTON SW, PERRIN MH, CORRIGAN AZ, LEWIS KA, RIVIER JE, VAUGHAN JM, VALE WW. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* 1996; 137: 2167-2170.

DUNN JS, SHEENAN HL, MCLEITCHIE NGB. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet*. 1943. i: 484-487.

FISHER LA, RIVIER J, RIVIER C, SPIESS J , VALE W, BROWN MR. Corticotripin-releasing factor (CRF): central effects on mean arterial pressure and heart rate in rats. *Endocrinology* 1982; 110: 2222-2224.

FUJIO Y, NGUYEN T, WENCKER D, KITSIS RN, WALSH. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*. 2000 Feb 15; 101(6):660-7.

GALIONE A, LEE HC, BUSA WB. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*. 1991 Sep 6; 253 (5024):1143-6.

GARCIA MJ, McNAMARA P, GORDON T, KANNELL WB. Morbidity and mortality in diabetes in the Framingham population: Sisten year follow-up study. *Diabetes*. 1974; 23: 105-111.

GARCIA-VILLALON AL, SANZ E, MONGE L, FERNANDEZ N, MARTINEZ MA, CLIMENT B, DIEGUEZ G. Vascular reactivity to vasopressin during diabetes: gender and regional differences. *Eur J Pharmacol.* 2003 Jan 17;459(2-3):247-54.

GISCLARD V, MILLER VN, VANHOUTTE PM. Effect of 17 β - estradiol on endothelial dependent responses in the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 244: 19-22.

GIVEN MB, GREENBERG SS, GILES TD. Coronary vasodilator responses to bradykinin in euglycemic and diabetic rats. *Am J Hypertens* 2001 May;14(5 Pt 1):446-54.

GLOCKER S, QUAST U. Binding and effects of P1075, an opener of ATP-sensitive K⁺ channels, in the aorta from streptozotocin-treated diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997 Aug;356 (2):210-5.

GOETZ RM, MORANO I, CALVONI T, STUDER R, HOLTZ J. Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 205: 905-910.

GOLDSCHMID MG, BARRETT-CONNOR E, EDELSTEIN SL, WINGARD DL, COHN BA, HERMAN WH. Dyslipidemia and ischemic heart disease mortality among men and women with diabetes. *Circulation.* 1994; 89 (3):991-7.

GRADY D, RUBIN SM, PETITTI DB, BLACK D, ETTINGER B, ERNSTER YL, CUMINGS SR. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1992; 117: 1016-1037.

GULYAS J, RIVIER C, PERRIN M, KOERBER SC, SUTTON S, CORRIGAN A, LAHRICHI SL, CRAIG AG, VALE W, RIVIER J. Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov 7;92(23):10575-9.

HALLER H. Endothelial function. General Consideration. *Drugs* 1997; 53: 1-10.

HAYASHI T, FUKUTO JM, IGNARRO LJ, CHAUDHURI G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc. Of Natl. Acad Sci U.S.A.* 1992; 89: 11259-11263.

HAYASHI T, YAMADA K, ESAKI T, KUZUYA M, SATAKE S, ISHIKAWA T, HIDAKA H, IGUCHI A. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Sep 25;214(3):847-55.

HEINRICHS SC & DE SOUZA EB. Corticotropin-releasing factor antagonists, binding-protein, and receptors: Implications for central

nervous system disorders. Baillere's Clin Endocrinol Metabol 1999; 13: 541-554.

HEINRICHS SC, RICHARD D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 1999; 33: 350-359.

HEINRICHS SC, TACHE Y. Therapeutic potential of CRF receptor antagonists: a gut-brain perspective. *Expert Opin Invest Drugs* 2001; 10: 647-659.

HIGASHIDA H, HASHII M, YOKOYAMA S, HOSHI N, CHEN XL, EGOROVA A, NODA M, ZHANG JS. Cyclic ADP-ribose as a second messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase. *Pharmacol Ther.* 2001 May-Jun; 90 (2-3):283-96. Review.

HOLLOWAY AC, HOWE DC, CHAN G, CLIFTON VL, SMITH R, CHALLIS JRG. Urocortin: a mechanism for the sustained activation of the HPA in the late gestation ovine fetus?. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Jul;283(1):E165-71.

HSU SY & HSUEH AJW. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 2001; 7:605-611.

HUANG Y, CHAN FL, LAU CW, TSANG SY, HE GW, CHEN ZY, YAO X. Roles of cyclic AMP and Ca(2+)-activated K(+) channels in endothelium-independent relaxation by urocortin in the rat coronary artery. Cardiovasc Res 2003; 57(3):824-33.

HUANG Y, CHAN FL, LAU CW, TSANG SY, HE GW, CHEN ZY, YAO X. Urocortin-induced endothelium-dependent relaxation of rat coronary artery: role of nitric oxide and K⁺ channels. J Card Surg. 2002 Jul-Aug;17(4):347-9.

ICHIKAWA T, MCMASTER D, LEDERIS K, KOBAYASHI H. Isolation and amino acid sequence of urotensin I, a vasoactive and ACTH-releasing neuropeptide, from the carp (*Cyprinus carpio*) urophysis. Peptides 1982; 3: 859-867.

IINO K, SASANO H, OKI Y, ANDOH N, SHIN RW, KITAMOTO T, TOTSUNE K, TAKAHASHI K, SUZUKI H, NAGURA H, YOSHIMI T. Urocortin expression in human pituitary gland and pituitary adenoma. J Clin Endocrinol 1997; 82: 3842-3850.

IINO K, SASANO H, SUZUKI T. Urocortin expression in mucosal inflammatory cells of human gastrointestinal tract (Abst P2-561). In: Endocrine Soc Meeting, June 1998, New Orleans, Louisiana.

IKEDA K, TOJO K, SATO S, EVISAWA T, TOKUDOME G, HOSOYA T, HARADA M, NAKAGAWA O, NAKAO K. Urocortin, a newly identified

corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, stimulates atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide secretions from neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 18;250(2):298-304.

INGLE DJ. The producción of experimental glucosuria in rat. *Recent Prog. Horm. Res.* 1948; 2: 229-253.

JACKSON WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 2000;35:173-178.

JAGGAR JH, PORTER VA, LEDERER WJ, NELSON MT. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 Feb;278(2):C235-56.

JARRET RJ. Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 1989; 5: 547-558.

KÄHÖNEN M, TOLVANEN JP, SALLINEN K, WU X, PORSTI I. Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am J Physiol.* 1998 Jul; 275 (1 Pt 2):H15-22.

KANNAN MS, PRAKASH YS, BRENNER T, MICKELSON JR, SIECK GC. Role of ryanodine receptor channels in Ca²⁺ oscillations of porcine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.* 1997 Apr; 272 (4 Pt 1):L659-64.

KASTRUP J. The diabetic arteriole: the impact of diabetic microangiopathy on microcirculatory control. *Dan. Med. Bull.* 1988; 35: 334-345.

KAUSER K & RUBANYI GM. 17β - estradiol and endothelial nitric oxide synthase. *Endothelium*. 1994; 2: 203-208.

KAUSER K & RUBANYI GM. Effect of 17β - estradiol on endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995; 25: 517-523.

KAUSER K, RUBANYI GM. Potential cellular signaling mechanisms mediating upregulation of endothelial nitric oxide production by estrogen. *J Vasc Res*. 1997 May-Jun; 34 (3):229-36. Review.

KISHIMOTO R, PEARSE II RV, LIN CR, ROSENFELD MG. A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1108-1112.

KNOT HJ, STANDEN NB, NELSON MT. Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall $[Ca^{2+}]$ in cerebral arteries of rat via Ca^{2+} -dependent K^{+} channels. *J Physiol*. 1998 Apr 1; 08 (Pt 1):211-21.

KOOB GF, COLE BJ, SWERDLOW NR, LE MOAL M, BRITTON KT. Stress, performance, and arousal: focus on CRF. *NIDA Res Monogr* 1990; 97:163-76.

KOSOYAN HP, WEI JY, TACHÉ Y. Intracisternal sauvagine is more potent than corticotropin-releasing factor to decrease gastric vagal efferent activity in rats. *Peptides* 1999; 851-858.

KOZICZ TH, YANAIHARA H, ARIMURA A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 1998; 391:1-10.

KRYSIAK R, OBUCHOWICZ E, HERMAN ZS. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) in anxiety. *Pol J Pharmacol* 2000; 52: 15-25.

KUEMMERLE JF, MAKHLOUF GM. Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in intestinal longitudinal muscle. *J Biol Chem*. 1995 Oct 27; 270 (43):25488-94.

KUME H, HALL IP, WASHABAU RJ, TAKAGI K, KOTLIKOFF MI. Beta-adrenergic agonists regulate KCa channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest*. 1994 Jan; 93 (1):371-9.

LANGENSTROER P, PIEPER GM. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol*. 1992 Jul; 263 (1 Pt 2):H257-65.

LATCHMAN DS. Urocortin protects against ischemic injury via a MAPK-dependent pathway. *TMC* 2001; 11(5): 167-169.

LEDERIS K, LETTER A, MACMASTER D, ICHIKAWA T, MACCANNELL KL, KOBAYASHI Y, RIVIER J, VALE W, FRYER J. Isolation, analysis of structure, synthesis, and biological actions of urotensin I neuropeptides. *Can J Biochem Cell Biol* 1983; 61: 602-614.

LEDERIS K, VALE W, RIVIER J, MACCANNELL KL, MACMASTER D, KOBAYASHI Y, SUESS U, LAWRENCE J. Urotensin I- a novel CRF-like peptide in *Catostomus commersoni* urophysis. *Proc West Pharmacol Soc* 1982; 25: 223-227.

LEE HC, AARHUS R. Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Jun 24; 1164 (1):68-74.

LEE HC, WALSETH TF, BRATT GT, HAYES RN, CLAPPER DL. Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity. *J Biol Chem*. 1989 Jan 25; 264 (3):1608-15.

LEE HC. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev*. 1997 Oct; 77 (4):1133-64.

LEE YH, PARK BG, AHN DS, KANG BS. Characteristics of Ca²⁺ release mechanisms from an intracellular Ca²⁺ store in rabbit coronary artery. *Yonsei Med J*. 1996 Feb; 37 (1):38-46.

LEFEUVRE RA, ROTHWELL NJ, SOCK MJ. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin-releasing hormone in rat. *Neuropharmacology* 1987; 26: 1217-1221.

LEITCH IM, BOURA ALA, BOTTI C, READ MA, WALTERS WAW, SMITH R. Vasodilator actions of urocortin and related peptides in the human perfused placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4510-4513.

LENZ H, FISHER L, VALE W, BROWN M. Corticotropin-releasing factor, sauvagine and urotensin I: effects on blood flow. *Am J Physiol* 1985; 249: R85-90.

LEWIS K, LI C, PERRIN MH, BLOUNT A, KUNITAKE K, DONALDSON C, VAUGHAN J, REYES TM, GULYAS J, FISCHER W, BILEZIKJIAN L, RIVIER J, SAWCHENKO PE, VALE WW. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98: 7570-7575.

LIM SC, CABALLERO E, ARORA S, SMAKOWSKI P, BASHOFF EM, BROWN FM, LOGERFO FW, HORTON ES, VEVES A. The Effect of hormonal replacement therapy on the vascular reactivity and endothelial function of healthy individuals and individuals with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 4159-4164.

LOICHOT C, ANJUERE J, NISATO D, DE JONG W, IMBS JL, BARTHELMEBS M. Renal vascular reactivity to vasopressin in rats with diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2001 Nov 23;431(3):321-9.

LOVENBERG TW, CHALMERS DT, LIU C, DE SOUZA EB. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 1995; 136: 4139-4142.

LUBOMIROV L, GAGOV H, PETKOVA-KIROVA P, DURIDANOVA D, KALENTCHUK VU, SCHUBERT R. Urocortin relaxes rat tail arteries by a PKA-mediated of the sensitivity of the contractile apparatus for calcium. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1564-1570.

MADDOX YT, FALCON JG, RIDINGER M, CUNARD CM, RAMWELL PW. Endothelium dependent gender differences in the response of the rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987; 240: 392-395.

MAYHAN WG, SIMMONS LK, SHARPE GM. Mechanism of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am J Physiol.* 1991 Feb;260(2 Pt 2):H319-26.

MAYHAN WG, SUN H, IRVINE SD. Influence of gender on dilatation of the basilar artery during diabetes mellitus. *Brain Res.* 2002; 930: 182-190.

MENDELSON ME, KARAS RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol.* 1994; 9: 619-626.

MENDELSON ME, KARAS RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999 Jun 10;340(23):1801-11.

MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1999; 43: 109-142.

MONTECUCCHI PC, ANASTASI A, DE CASTIGLIONE R, ERSAMER V. Isolation and amino acid composition of sauvagine. An active polypeptide

from metanol extracts of the skin of the South American frog *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res* 1980; 16:191-199.

MORENO JM, WANGENSTEEN R, SAINZ J, RODRIGUEZ-GOMEZ I, CHAMORRO V, OSUNA A, VARGAS F. Role of Endothelium-Derived Relaxing Factors in the Renal Response to Vasoactive Agents in Hypothyroid Rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Mar 25 [epub ahead of print].

NISHIKIMI T, MIYATA A, HORIO T, YOSHIHARA F, NAGAYA N, TAKISHITA S, YUTANI C, MATSUO H, MATSUOKA H, KANGAWA K. Urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, in normal and diseased heart. *Am J Physiol* 2000;279:H3031-H3039.

NOZU T, MARTÍNEZ V, RIVIER J, TACHE Y. Peripheral urocortin delays gastric emptying: role of CRF receptor 2. *Am J Physiol* 1999; 276: G867-G874.

OKI Y, IWABUCHI M, MASUZAWA M, WATANABE F, OZAWA M, IINO K, TOMINAGA T, YOSHIMI T. Distribution and concentration of urocortin, and affect of adrenalectomy on its content in rat hypothalamus. *Life Sci* 1998; 62: 807-812.

OKOSI A, BRAR BK, CHAN M, DE SOUZA L, SMITH E, STEPHANOU A, LATCHMAN DS, CHOWDREY HS, KNIGHT RA. Expression and

protective effects of urocortin in cardiac myocytes. *Neuropeptides* 1998; 32: 167-171.

OWENS JJ, NEMENROFF CB. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 425-473.

ÖZTÜRK Y, ALTAN VM, YILDIZOGLU-ARI N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* 1996; 48: 69-112.

OZYAZGAN S, UNLUCERCI Y, BEKPINAR S, AKKAN AG. Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine (AMNG) treatment. *Int J Exp Diabetes Res* 2000;1(2):145-53.

PALCHAUDHURI MR, HAUGER RL, WILLW S, FUCHS E, DAUTZENBERG FM. Isolation and pharmacological characterization of two functional splice variants of corticotropin-releasing factor type 2 receptor from *Tupaia belangeri*. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 419-428.

PARKES D, VAUGHAN J, RIVIER J, VALE W, MAY C. Cardiac inotropic actions of urocortin in conscious sheep. *Am J Physiol* 1997;272:H2115-H2122.

PARKES DG, MAY CN. Urocortin: a novel player in cardiac control. *News Physiol Sci.* 2000;15:264-268.

PARKES DG, WEISINGER RS, MAY CN. Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update. *Peptides* 2001;22:821-827.

PEREZ G, TORO L. Differential modulation of large-conductance KCa channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. *Am J Physiol.* 1994 May; 266 (5 Pt 1):C1459-63.

PERRIN M, DONALDSON C, CHEN R, BLOUNT A, BERGGREN T, BILEZIKJIAN L, SAWCHENKO P, VALE W. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 2969-2973.

PERRIN M, SUTTON SW, CERVINI L. Comparison of an agonist, urocortin, and an antagonist, astressin, as radioligands for characterization of CRF receptors. *J Pharm Exp Ther* 1999; 288:729-734

PETRAGLIA F, FLORIO P, BENEDETTO C, MAROZIO L, DI BLASIO AM, TICCONI C, PICCIONE E, LUISI S, GENAZZANI AR, VALE W. Urocortin stimulates placental adrenocorticotropin and prostaglandin release and myometrial contractility in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;84:1420-1423.

PIEPER GM, MEI DA, LANGENSTROER P, O'ROURKE ST. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta. *Am J Physiol.* 1992 Sep; 263 (3 Pt 2):H676-80.

PIEPER GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction. Hypertension. 1998 May; 31 (5):1047-60.

PINNA C, CIGNARELLA A, ZANARDO R, BOLEGO C, PUGLISI L. Gender differences and antioxidant treatment affect aortic reactivity in short-term diabetic rats. Eur J Pharmacol. 2001 Nov 9; 431 (1):71-9.

PORTER VA, BONEV AD, KNOT HJ, HEPPNER TJ, STEVENSON AS, KLEPPISCH T, LEDERER WJ, NELSON MT. Frequency modulation of Ca^{2+} sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. Am J Physiol. 1998 May; 274 (5 Pt 1):C1346-55.

POTTER E, SUTTON S, DONALDSON C, CHEN R, PERRIN M, LEWIS K, SAWCHENKO PE, VALE W. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 8777-8781.

PRAKASH YS, KANNAN MS, WALSETH TF, SIECK GC. Role of cyclic ADP-ribose in the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in porcine tracheal smooth muscle. Am J Physiol 1998 Jun; 274(6 Pt 1):C1653-60.

RAILSON JE, LIAO Z, BRAR BK, BUDDLE JC, PENCA D, STEPHANOU A, LATCHMAN DS. Cardiotrophin-1 and urocortin cause protection by the same pathway and hypertrophy via distinct pathway in cardiac myocytes. Cytokine 2002; 17(5): 243-253.

RAKIETEN N, RAKIETEN ML, NADKARNI MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC- 37917). *Cancer Chemother. Rep.* 1963; 29: 91-98.

REYES TM, LEWIS K, PERRIN MH, KUNITAKE KS, VAUGHAN J, ARIAS CA, HOGENESCH JB, GULYAS J, RIVIER J, VALE WW, SAWCHENKO PE. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2001; 98: 2843-2848.

RIVEST S, RIVIER C. The role of corticotropin-releasing factor in the anorexia induced by exercise. *Brain Res Bull* 1990; 25: 169-172.

RIVIER C, RIVIER J, LEDERIS K, VALE W. In vitro and in vivo ACTH-releasing activity of ovine CRF, sauvagine and urotensin I. *Regul Pept* 1983; 5: 139-143.

RUBANYI GM & VANHOUTTE PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1986; 250: H815-H821.

RUBINSTEIN G. Is the neuropeptide urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, involved in schizophrenia?. *Schizophrenia Research* 2000; 42: 165-166.

SÁNCHEZ MM, YOUNG LJ, PLOTSKY PM, INSEL TR. Autoradiographic and *in situ* hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and

2 receptors in nonhuman primate brain. *J Comp Neurol* 1999; 408: 365-377.

SANZ E, FERNANDEZ N, MONGE L, CLIMENT B, DIÉGUEZ G A, GARCÍA-VILLALON AL. Role of potassium channels in the coronary and renal vascular reactivity to vasopressin in diabetic rats. *Am J. Pharmacol.* (En prensa)

SANZ E, FERNANDEZ N, MONGE L, MARTINEZ MA, CLIMENT B, DIEGUEZ G, GARCIA-VILLALON AL. Effects of diabetes on the vascular response to nitric oxide and constrictor prostanoids: gender and regional differences. *Life Sci* 2003 Feb 14;72(13):1537-47.

SANZ E, MONGE L, FERNANDEZ N, MARTINEZ MA, DIEGUEZ G, GARCIA-VILLALON AL. Diabetes abolishes the gender difference in vasopressin-mediated potentiation of sympathetic vasoconstriction. *Eur J Pharmacol.* 2001; 427 (3): 243-50.

SANZ E., MONGE L., FERNÁNDEZ N., MARTÍNEZ M.A., MARTÍNEZ-LEÓN J.B., DIÉGUEZ G.& GARCÍA VILLALÓN A.L. Relaxation by urocortin of human saphenous veins. *Br. J. Pharmacol.*; 2002: 136, 90-94.

SCARABELLI TM, PASINI E, STEPHANOU A, COMINI L, CURELLO S, RADDINO R, FERRARI R, KNIGHT R, LATCHMAN DS. Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetic recovery and improves cell

survival en the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion. *J Am Coll Cardio* 2002; 40(1): 155-161.

SCHILLING L, KANZLER CH, SCHMIEDEK P, EHEREICH H. Characterization of the relaxant action of urocortin, a new peptide related to corticotropin-releasing factor in the rat isolated basilar artery. *Br J Physiol* 1998;125:1164-1171.

SCORNIK FS, CODINA J, BIRNBAUMER L, TORO L. Modulation of coronary smooth muscle K_{Ca} channels by Gs alpha independent of phosphorylation by protein kinase A. *Am J Physiol*. 1993 Oct; 65 (4 Pt 2): H1460-5.

SEEMAN T, MENDES DE LEON C, BERKMAN L, OSTFELD A. Risk factors for coronary heart disease among older men and women: a prospective study of community-dwelling elderly. *Am J Epidemiol*. 1993; 138 (12):1037-49.

SHEYKHZADE M, NYBORG NC. Characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in intramural coronary arteries from male and female Sprague Dawley rats. *Br J Pharmacol*. 1998 Apr; 123 (7):1464-70.

SHIMIZU K, MURAMATSU M, KAKEGAWA Y, ASANO H, TOKI Y, MIYAZAKI Y, OKUMURA K, HASHIMOTO H, ITO T. Role of prostaglandin

H2 as an endothelium-derived contracting factor in diabetic state. *Diabetes*. 1993 Sep; 42 (9):1246-52.

SKELTON KH, OWENS MJ, NEMEROFF CB. The neurobiology of urocortin. *Regulatory peptides* 2000; 93: 85-92.

SOTNIKOVA R, NOSALOVA V, STEFEK M, STOLC S, GAJDOSIK A, GAJDOSIKOVA A. Streptozotocin diabetes-induced changes in aorta, peripheral nerves and stomach of Wistar rats. *Gen Physiol Biophys* 1999 Oct;18 Spec No:155-62.

SOWERS JR. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. *Arch. Int. Med.* 1998; 158: 617-621.

SPERLE K, CHEN A, KOSTICH W, LARGENT BL. CRH-2 γ : a novel CRH2 receptor isoform found in human brain. 27 th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, 25-30 october 1997. *Soc Neurosci Abstr* 23: 1765.

SPINA M, MERLO-PICH E, CHAN RKW, BASSO AM, RIVIER J, VALE WW, KOOB GF. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 1996; 273:1561-1564.

STALLONE JN, CROFTON JT, SHARE L. Secual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta. *Am. J. Physiol.* 1991; 260: H453-H458.

STAMLER J, VACCARO O, NEATON JD, WENT-WORTH D. The Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group: Diabetes, other risk factors and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 1993; 434-444.

STAMPFER MJ, COLDITZ GA, WILLETT WC, MANSON JE, ROSNER B, SPEIZER FE, HENNEKENS CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten year follow-up from the Nurses Health Study. *N. Engl J Med*. 1991; 325: 756-762.

STEINBERG HO, PARADISI G, CRONIN J, CROWDE K, HEMPFLING A, HOOK G, BARON AD. Type II diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women. *Circulation*. 2000; 101: 2040-2046.

STENZEL P, KESTERSON R, YEUNG W, CONE RD, RITTENBERG MB, STENZEL-POORE MP. Identification of a novel murine receptor for corticotropin-releasing hormone expressed in the heart. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 637-645.

TACHÉ Y, CUNION MM, STEPHENS R. CRF: central nervous system action to influence gastrointestinal function and role in the gastrointestinal response to stress. In: De Souza EB, Nemeroff CB (Eds), *Corticotropin-releasing Factor: Basic and Clinical Studies of a Neuropeptide*. CRC, Boca Raton 1990, pp 299-307.

TAKAHASHI K, TOTSUNE K, SONE M., MURAKAMI O, SATOH F, ARIHARA Z, SASANO H, IINO K, MOURI T. Regional distribution of urocortin-like immunoreactivity and expression of urocortin mRNA in the human brain. *Peptides* 1998; 19: 643-647.

TERUI K, HIGASHIYAMA A, HORIBA N, FURUKAWA K-I, MOTOMURA S, SUDA T. Coronary vasodilation and positive inotropism by urocortin in the isolated rat heart. *J Endocrinol* 2001;169:177-183.

TERUI K, HIGASHIYAMA A, HORIBA N, MOTOMURA S, SUDA T. Coronary vasodilation and positive inotropism by urocortin in the isolated rat heart. 81st Annual Meeting of endocrine Society 1999; 9: 637-645.

TESFAMARIAM B, BROWN ML, COHEN RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest.* 1991 May;87(5):1643-8.

TESFAMARIAM B, JAKUBOWSKI JA, COHEN RA. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂. *Am J Physiol.* 1989 Nov;257(5 Pt 2):H1327-33.

VALDENNAIRE O, GILLER T, BREU V, GOTTOWIK J, KILPATRICK G. A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1352: 129-132.

VALDENNAIRE O., GILLER T., BREU V., GOTTOWID J. & KILPATRICK G. A new functional isoform of the human CRF₂ receptor for corticotropin-releasing factor. *Biochim Biophys Acta*. 1997 May 30; 1352(2):129-32.

VALDIVIA HH, KAPLAN JH, ELLIS-DAVIES GC, LEDERER WJ. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation. *Science*. 1995 Mar 31; 267 (5206):1997-2000.

VALE W, SPIESS J, RIVIER C, RIVIER J. Characterization of 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981; 213: 1394-1397.

VANHEEL B & VAN DE VOORDE J. EDHF and residual NO: different factors. *Cardiovasc. Res*. 2000; 46: 370-375.

VARGAS F, OSUNA A. Modulatory role of endothelium-derived relaxing factors on the response to vasoconstrictors and flow-pressure curve in the isolated perfused rat kidney. *J Vasc Res*. 1996 Mar-Apr; 33(2):119-23.

VARGAS F, SABIO JM, LUNA JD. Contribution of endothelium derived relaxing factors to acetylcholine induced vasodilatation in the rat kidney. *Cardiovasc Res*. 1994 Sep;28(9):1373-7.

VAUGHAN J, DONALDSON C, BITTENCOURT J, PERRIN MH, LEWIS K, SUTTON S, CHAN R, TURNBULL A, LOVEJOY D, RIVIER C, RIVIER J, SAWCHENKO P, VALE W. Urocortin, a mammalian neuropeptide

related to fish urotensin 1 and corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995;378:287-292.

VILLAR ALVAREZ F, BANEGAS JR, RODRÍGUEZ ARTALEJO F, REY CALREO J. Mortalidad cardiovascular en España y sus Comunidades Autónomas (1975-1992). *Med Clin (Barc)* 1998; 110: 321-327.

WANG R, WANG Z, WU L, HANNA ST, PETERSON-WAKEMAN R. Reduced vasorelaxant effect of carbon monoxide in diabetes and the underlying mechanisms. *Diabetes*. 2001 Jan; 50 (1):166-74.

WATANABE F, OKI Y, OZAWA M, MASUZAWA M, IWABUCHI M, YOSHIMI T, NISHIGUCHI T, IINO K, SASANO H. Urocortin in human placenta and maternal plasma. 1999; 20: 205-209.

WEAVER DC, MCDANIEL ML, NABER SP, BARRY D, LACY PE. Alloxan stimulation and inhibition from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes*. 1978; 27: 1205-1214.

WEINER CP, LIZASOAIN I, BAYLIS SA, KNOELES RG, CHARLES IG, MONCADA S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Of Natl. Acad Sci U.S.A.* 1994; 91: 5212-5216.

WILSON HL, DIPP M, THOMAS JM, LAD C, GALIONE A, EVANS AM. Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6; 276 (14):11180-8.

WONG ML, AL-SHEKHLI A, BONGIORNO PB, ESPOSITO A, KHATRI P, STERNBERG EM, GOLD PW, LICINIO J. Localization of urocortin messenger RNA in rat brain and pituitary. *Mol Psychiatry* 1996; 1:307-312.

YAMAMOTO HT, MAEDA M, FUJIMURA M. Urocortin-like immunoreactivity in the substantia nigra, ventral tegmental area and Edinger-Westphal nucleus of rat. *Neurosci Lett* 1998; 243: 21-24.

YANG CH, MURTI A, PFEFFER SR, KIM JG, DONNER DB, PFEFFER LM. Interferon alpha /beta promotes cell survival by activating nuclear factor kappa B through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27; 276(17):13756-61.

YANG Z, VON SEGESSER L, BAUER E, STULZ P, TURINA M, LÜSCHER TF. Different activation of the endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. *Circ Res* 1991;68:52-60.

YAO X, HE GW, CHAN FL, LAU CW, TSANG SY, CHEN ZY, HUANG Y. Endothelium-dependent and -independent coronary relaxation induced by urocortin. *J Card Surg*. 2002 Jul-Aug;17(4):347-9.

YOUSIF MH, CHERIAN A, ORIOWO MA. Endothelium-dependent relaxation in isolated renal arteries of diabetic rabbits. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2002 Apr;22(2):73-82.

ZHAO L, DONALDSON CJ, SMITH GW, VALE WW. The structures of the mouse and human urocortin genes (*Ucn* and *UCN*). Regul Pept 2000; 50:23-33.